

Genetisches Institut
Fachbereich 08 (Fachrichtung Biologie)
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Funktionelle Charakterisierung der
CTCF-vermittelten und hormonsensitiven
Enhancer-Blockade**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades**

**vorgelegt von Christine Weth
Gießen, Juni 2006**

**Dekan: Prof. Dr. Peter Schreiner
1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Trenczek**

PUBLIKATIONSLISTE

Weth, C., Leers, J., Klaus, O., and Renkawitz, R. 2006 (submitted). **Composite enhancer blocking: TR and CTCF synergize and control chromatin loop formation.**

Burke LJ, Zhang R, Bartkuhn M, Tiwari VK, Tavoosidana G, Kurukuti S, **Weth C**, **Leers J**, **Galjart N**, Ohlsson R, Renkawitz R. (2005) **CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin.** EMBO J. 21;24(18):3291-300.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|--|
| A | Ampere (Stromstärke) |
| α | anti |
| 3-ABA | 3-Aminobenzamid |
| Abb. | Abbildung |
| ac | acetyliert |
| Acetyl-CoA | Acetyl-Coenzym A |
| Amp | Ampicillin |
| Amp ^R | Ampicillinresistenz |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| APP | Amyloides Vorläuferprotein |
| AR | Androgenrezeptor |
| AS | Aminosäure |
| as | antisense |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| Bp | Basenpaar(e) |
| bq | Bequerel [Zerfall/sec] |
| bHLH | <i>basic Helix Loop Helix</i> -Motiv |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ChIP | Chromatin-Immunopräzipitation |
| Ci | Curie [=3,7·10 ¹⁰ bq] |
| CIAP | <i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (alkalische Kälberdarm-Phosphatase) |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| cpm | <i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute) |
| CsCl | Cäsiumchlorid |
| CTCF | <i>CCCTC-binding factor</i> (CCCTC-Bindefaktor) |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| CTS | <i>CTCF target site</i> (CTCF-Bindestelle) |
| Da | Dalton [g/Mol] |
| DBD | DNA-Bindedomäne |
| ddH ₂ O | bidestilliertes Wasser |
| ddNTP | 2',3'-Didesoxynucleosid-5'Triphosphat |

| | |
|-------------------|--|
| DEAE | Diethylaminoethan |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| d.h. | das heißt |
| dimet | dimethyliert |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMR | <i>Differentially methylated region</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotid-Triphosphat |
| DR | <i>direct repeat</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Extinktion |
| EBV | Eppstein-Barr-Virus |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMSA | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> |
| ER | Östrogenrezeptor |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflussscytometrie) |
| fl | <i>full length</i> (vollständig) |
| F1, F2 | Footprint 1,2 für CTCF/TR-Bindestellen am Hühner-Lysozym-Silencer |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| g | Gramm |
| gal ₉₄ | Aminosäuren 1-94 des Hefe-Gal4-Aktivatoren |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> (grünes fluoreszierendes Protein) |
| GST | Gluthation-S-Transferase |
| h | Stunde(n) |
| HAT | Histonacetyltransferase |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-Sulfonsäure |
| HMT | Histonmethyltransferase |
| HRE | <i>hormon response element</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase) |
| HS | DNase I hypersensitive-Stelle |
| ICR | <i>Imprinting control region</i> |

| | |
|--------------------|---|
| IP | <i>inverted palindrom</i> |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactosid |
| k | kilo [10^3] |
| K | Lysin |
| kb | Kilobase (=1000 Basenpaare) |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LacZ | Gen für β-Galactosidase |
| LB | Luria-Bertani (Medium) |
| LBD | Liganden-Bindedomäne |
| Lsg | Lösung |
| Lys | Lysozym |
| m | milli [10^{-3}] |
| M | Molar [mol/l] |
| MAR | <i>nuclear matrix attachment region</i> (Kernmatrix-angelagerte Regionen) |
| MCS | <i>Multiple Cloning Site</i> |
| MeOH | Methanol |
| min | Minute |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> (Boten-RNA) |
| MW | Molekulargewicht |
| μ | mikro [10^{-6}] |
| n | nano [10^{-9}] |
| NaAc | Natriumacetat |
| Neo ^r | Neomycin (G418)-Resistenz |
| NH ₄ Ac | Ammoniumacetat |
| NP40 | Nonidet P40; Ethylenphenyl-Polyethylenglycol |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| OD | Optische Dichte |
| ONPG | o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid |
| Ori | <i>origin of replication</i> (Replikationsursprung) |
| p | pico [10^{-12}] |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAR | Poly(ADP)Ribose |
| PARlierung | Poly(ADP)Ribosylierung |
| PARP | PAR-Polymerase |

| | |
|--------------|--|
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| Pen | Penicillin |
| PIPES | Piperazin-N,N`bis-(2-ethansulfonsäure) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonsäurefluorid |
| PolyA | Polyadenylierungssignal |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RLU | <i>relative light units</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RSV | Rous-Sarcoma-Virus |
| RT | Raumtemperatur |
| RXR | Retinoid-X-Rezeptor |
| s | sense |
| S-2,4 kb | Silencer des Hühner-Lysozymgens bei -2,4 kb |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| Strep | Streptomycin |
| SV40 | Simian-Virus 40 |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TB | Teriffic Broth (Medium) |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBP | TATA-Bindeprotein |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',n`-Tetramethylendiamin |
| TERT | katalytische Untereinheit der Telomerase |
| Tet | Tetrazyklin |
| TK | Thymidinkinase |
| T3 | 3,5,3'-Triiodothyronin, Thyroidhormon |
| TR | Thyroidhormon-Rezeptor |
| TRE | <i>Thyroid hormone response element</i> |
| TRIAC | 3,3',5-Triiodothyronin-Essigsäure |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan |
| Triton-X-100 | Oktylphenol-Ethylenglykolether |
| TSA | Trichostatin A |

| | |
|----------|---|
| Tween 80 | Polyoxyethylensorbitan-monooleat |
| u | <i>unit</i> (Einheit) |
| UAS | <i>activating upstream sequence</i> |
| UV | Ultraviolettes Licht (Wellenlänge < 340 nm) |
| UZ | Ultrazentrifuge |
| V | Volt (Spannung) |
| (v/v) | Volumenanteile |
| W | Watt (Leistung) |
| (w/v) | Masse pro Volumen |
| (w/w) | Massenanteile |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 1 EINLEITUNG..... | 2 |
| 1.1 Das Multitalent CTCF | 2 |
| 1.2 Isolatoren unterteilen das Genom in funktionelle Bereiche | 6 |
| 1.3 CTCF vermittelt die Blockade von Enhancern..... | 7 |
| 1.4 Thyroidhormon kann die Enhancer-Blockade beeinflussen | 9 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 12 |
| 2 MATERIAL..... | 13 |
| 2.1 Geräte | 13 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 14 |
| 2.3 Chemikalien | 15 |
| 2.4 Enzyme | 18 |
| 2.5 Komplettausrüstungen | 18 |
| 2.6 DNA-Längenstandardmarker | 19 |
| 2.7 Protein-Molekulargewichtsmarker | 19 |
| 2.8 Oligonukleotide | 19 |
| 2.9 Vektoren..... | 23 |
| 2.10 Antikörper..... | 26 |
| 2.11 Bakterienstämme | 27 |
| 2.12 Eukaryontische Zelllinien..... | 27 |
| 2.13 Allgemeine Vorbereitungen | 29 |
| 3 METHODEN..... | 30 |
| 3.1 Allgemeines Arbeiten mit DNA | 30 |
| 3.1.1 Lagerung | 30 |
| 3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse | 30 |
| 3.1.2.1 Minipräparation | 30 |
| 3.1.2.2 Maxipräparation mit CsCl-Dichtegradient..... | 31 |
| 3.1.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen..... | 32 |
| 3.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.5 | Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen | 33 |
| 3.2 | Enzymatische Modifikation von DNA..... | 34 |
| 3.2.1 | Restriktionsspaltung | 34 |
| 3.2.2 | Auffüllen von 5`-Enden | 34 |
| 3.2.3 | Dephosphorylierung..... | 35 |
| 3.2.4 | Ligation | 35 |
| 3.2.5 | Sequenzierung von DNA | 35 |
| 3.2.6 | Polymerase Kettenreaktion (PCR)..... | 35 |
| 3.2.7 | Realtime-PCR..... | 36 |
| 3.3 | Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten | 36 |
| 3.3.1 | Agarosegele | 37 |
| 3.3.2 | DNA-Extraktion aus Agarosegelen | 37 |
| 3.4 | Hirt's Extraktion..... | 38 |
| 3.5 | Arbeiten mit RNA..... | 38 |
| 3.5.1 | Lagerung | 38 |
| 3.5.2 | Isolierung von RNA..... | 38 |
| 3.5.3 | RT-PCR | 39 |
| 3.5.4 | Northern Blot..... | 39 |
| 3.6 | Arbeiten mit Bakterien | 42 |
| 3.6.1 | Vermehrung und Lagerung | 42 |
| 3.6.2 | Herstellung kompetenter Bakterien..... | 42 |
| 3.6.3 | Transformation von Bakterien..... | 43 |
| 3.7 | Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien | 43 |
| 3.7.1 | Lagerung und Auftauen von eukaryontischen Zellen..... | 43 |
| 3.7.2 | Kultivierung eukaryontischer Zellen | 44 |
| 3.7.3 | Einfrieren eukaryontischer Zellen | 45 |
| 3.7.4 | DNA-Transfer in Zellen | 45 |
| 3.7.5 | Hormoninduktion in der transienten Transfektion | 47 |
| 3.7.6 | Ernte und Aufschluss der Zellen | 47 |
| 3.7.7 | Aktivitätsbestimmung der Luciferase (Luc-Assay) | 48 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.7.8 | Aktivitätsbestimmung der β -Galactosidase..... | 48 |
| 3.7.9 | FACS (<i>fluorescent activated cell sorting</i>)-Analyse..... | 49 |
| 3.8 | Arbeiten mit Proteinen..... | 49 |
| 3.8.1 | Lagerung von Proteinen | 49 |
| 3.8.2 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | 49 |
| 3.8.3 | Herstellung von Ganzzellextrakt | 50 |
| 3.8.4 | Herstellung von Kernextrakt | 51 |
| 3.8.5 | Denaturierende Polyacrylamidgele | 51 |
| 3.8.6 | Elektroblot..... | 53 |
| 3.8.7 | Immunodetektion | 53 |
| 3.8.8 | In vitro Transkription/Translation..... | 54 |
| 3.8.9 | Expression rekombinanter Proteine..... | 55 |
| 3.8.10 | Affinitätsaufreinigung GST-fusionierter Proteine..... | 55 |
| 3.8.11 | Acetylierung von rekombinanten Proteinen | 56 |
| 3.9 | Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen | 57 |
| 3.9.1 | Chromatin-Immunopräzipitation..... | 57 |
| 3.9.2 | Gelretardierungsexperiment (EMSA)..... | 59 |
| 3.10 | Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen | 60 |
| 3.10.1 | GST-Pulldown..... | 60 |
| 3.10.2 | Acetylierungsabhängige Interaktionsanalyse mittels GST-Pulldown | 60 |
| 3.10.3 | Histonbindungs-Assay | 61 |
| 3.10.4 | Histonmethyltransferase (HMT)-Assay | 61 |
| 4 | ERGEBNISSE | 63 |
| 4.1 | Charakterisierung des murinen APP-Promotors | 63 |
| 4.1.1 | Der murine APP-Promotor besitzt eine potentielle kombinierte CTCF/TR-Bindestelle..... | 63 |
| 4.1.2 | Murine N2a β -Zellen als Modell für die APP-Regulation..... | 64 |
| 4.1.3 | CTCF und TR binden im APP β -Promoter | 67 |
| 4.1.4 | T3-Behandlung führt zu einer Veränderung der Cofaktor-Rekrutierung und Chromatinmodifizierung im Bereich der CTCF/TR-Bindestellen | 71 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.2 | Episomen mit einem GFP-Reportergen als Modell zur Untersuchung der Enhancer-Blockade | 74 |
| 4.2.1 | FACS-Analyse der Episomen mit GFP-Reportergen und ICR-Isolator ... | 75 |
| 4.2.2 | Optimierung der Transfektionseffizienz der GFP-tragenden Episomen.. | 76 |
| 4.2.3 | JEG3-Zellen enthalten funktionellen TR | 78 |
| 4.2.4 | FACS-Analyse nach Transfektion der GFP-tragenden Episomen mit kombinierten CTCF/TR-Bindestellen | 79 |
| 4.3 | Episomen mit Luciferase-Reportergen als Modell zur Untersuchung der Enhancer-Blockade | 82 |
| 4.3.1 | Episomale Vektoren mit möglicher kombinierter CTCF/TR-Bindestelle des murinen APP β -Promotors | 82 |
| 4.3.2 | CTCF/TR-Bindestellen im APP β -Promotor vermitteln eine Zelltyp-spezifische Enhancer-Blockade im episomalen System..... | 83 |
| 4.3.3 | CTCF/TR-Bindestellen im APP β -Promotor zeigen keine hormonsensitive Enhancer-Blockade im episomalen System | 85 |
| 4.3.4 | Episomale Vektoren mit kombinierter CTCF/TR-Bindestelle des Hühner-Lysozyngens..... | 85 |
| 4.3.5 | F1F2 vermittelt Enhancer-Blockade und Aufhebung der Enhancer-Blockade auf Episomen | 86 |
| 4.4 | Episomales Chromatin erlaubt die Analyse der Enhancer-Blockade | 90 |
| 4.4.1 | <i>Knock-down</i> von CTCF führt zu einer Senkung der F1F2-vermittelten Enhancer-Blockade | 90 |
| 4.4.2 | Überexprimierung von CTCF erhöht die Enhancer-Blockade..... | 92 |
| 4.4.3 | Stabile F1F2-Episomen Zellklone zeigen unterschiedliche Aktivierung durch T3 | 94 |
| 4.4.4 | CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade ist sensitiv gegenüber HDAC- und Poly(ADP)Ribosylierungs-Inhibitoren..... | 96 |
| 4.5 | CTCF und TR synergieren in der Enhancer-Blockade | 98 |
| 4.5.1 | Mutation der CTCF-Bindestelle (F1) führt zu einem Verlust der Enhancer-Blockade | 98 |
| 4.5.2 | Mutation der TR-Bindestelle (F2) führt zu einem Verlust der Enhancer-Blockade | 100 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.5.3 | Die Bindung von CTCF ist in Anwesenheit von TR erhöht | 103 |
| 4.6 | CTCF und TR Interaktion | 105 |
| 4.6.1 | CTCF interagiert mit verschiedenen Mitgliedern der Kernhormon-Rezeptorfamilie..... | 105 |
| 4.6.2 | Ligand moduliert die CTCF-Rezeptor-Interaktion | 106 |
| 4.6.3 | Charakterisierung der Rezeptor-Interaktionsdomänen | 106 |
| 4.6.4 | Die minimale TR β -Interaktionsdomäne für CTCF dient nur unzureichend der Vermittlung der Enhancer-Blockade..... | 108 |
| 4.7 | CTCF-Deletionsdomänen in der hormonsensitiven Enhancer-Blockade.. | 109 |
| 4.7.1 | Titration des Gal-UASF2-Systems..... | 109 |
| 4.7.2 | CTCF N-Terminus und Zinkfinger vermitteln zusammen die hormonsensitive Enhancer-Blockade | 110 |
| 4.8 | Die Aufhebung der Enhancer-Blockade durch T3 ist von einer Veränderung des Chromatinstatus begleitet | 113 |
| 4.9 | CTCF-Interaktion mit Histonen als möglicher Mechanismus der hormonsensitiven Enhancer-Blockade | 116 |
| 4.9.1 | CTCF interagiert mit den N-terminalen Enden aller 4 Kernhistone | 116 |
| 4.9.2 | Die Acetylierung von Histonarmen durch pCAF oder p300 verändert nicht die Bindung an CTCF..... | 118 |
| 4.9.3 | Histonmethylierung als möglicher Mechanismus der Enhancer-Blockade | 120 |
| 4.10 | Die Interaktion zwischen RNA Polymerase II und dem Isolator (und DNA-Loop-Formation) findet nur während der Enhancer-Blockade statt | 122 |
| 5 | DISKUSSION | 126 |
| 5.1 | Analyse der hormonsensitiven Enhancer-Blockade mittels Episomen | 126 |
| 5.2 | CTCF und TR synergieren in der Enhancer-Blockade | 129 |
| 5.3 | CTCF- und TR-Interaktion | 131 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.4 | Involvierung von Cofaktoren und posttranslationale Modifizierungen in der hormonsensitiven Enhancer-Blockade | 132 |
| 5.5 | Hormon reguliert die Rekrutierung des Isolators an den Promotor | 134 |
| 5.6 | Ausblick | 137 |
| 6 | LITERATUR | 139 |
| 7 | ANHANG | 144 |
| 7.1 | Reporterkonstrukte | 144 |
| 7.2 | Plasmide für die bakterielle Expression | 151 |
| 7.3 | Eukaryontische Expressionsvektoren | 153 |

ZUSAMMENFASSUNG

Das ubiquitär exprimierte 11-Zinkfingerprotein CTCF spielt eine Rolle in einer Vielzahl von regulatorischen Vorgängen. Von großer Bedeutung ist, dass CTCF in höheren Eukaryonten der einzige Faktor ist, der die Enhancer-Blockade vermitteln kann. Dies ist ein Mechanismus, der Gene vor Enhancer-Einflüssen abschirmt, die von benachbarten Genen stammen. Es wurde bereits gezeigt, dass Thyroidhormon die Enhancer-Blockade auf CTCF-Bindestellen regulieren kann, die sich neben einem *Thyroid hormone response element* (TRE) befinden. In der vorliegenden Arbeit wurden episomale Vektoren für eine detaillierte Charakterisierung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade auf zusammengesetzten CTCF/TR-Bindestellen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Intensität der Enhancer-Blockade durch Überexprimierung oder Herunterregulierung von CTCF variiert werden kann. Weiterhin zeigte sich, dass in die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade die Rekrutierung von Histondeacetylasen involviert ist und teilweise von der posttranslationalen Modifikation der poly(ADP)Ribosylierung abhängt. Erstaunlicherweise führten Mutationsanalysen sowohl der CTCF- als auch der TR-Bindestelle zur Erkenntnis, dass beide funktionellen Bindestellen benötigt werden, um die Enhancer-Blockade zu vermitteln. ChIP-Analysen der episomalen Vektoren zeigten, dass die Aufhebung der Enhancer-Blockade durch einen Anstieg an aktivem und Verminderung an inaktivem Chromatin begleitet ist. Die Verwendung eines RNA Polymerase II-Antikörpers in Chromatin-Immunopräzipitationen führte zur Entwicklung eines Modells, welches beschreibt, dass der Isolator und Isolator-bindende Proteine (d.h. CTCF) sich physisch am Promotor befinden und dort die Enhancer-Wirkung auf die RNA Polymerase II verhindern. Die Anwesenheit von Hormon hingegen löst diese Blockade auf, da der Isolator wieder vom Promotor dissoziiert und der Enhancer auf den Promotor wirken kann. Um zu untersuchen, ob Hormon zu einer Konformationsänderung des CTCF/TR-Komplexes als Ursache der Aufhebung des Isolator-Promotor-Komplexes beitragen kann, wurden die Interaktionsdomänen innerhalb von CTCF und TR näher charakterisiert. Es wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von Ligand die Interaktion zwischen CTCF und TR bzw. RXR modulieren kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass CTCF und TR in der Enhancer-Blockade synergieren und dass die Enhancer-Blockade mit einer physischen Interaktion von Promotor- und Isolator-bindenden Faktoren einhergeht. Alle Ergebnisse zusammen demonstrieren das enge Wechselspiel von CTCF und dem TR bei der Regulation der Genexpression und geben Hinweise auf einen Mechanismus, welcher der funktionellen Isolierung von Chromatin-Domänen in Vertebraten zugrunde liegen könnte.

1 EINLEITUNG

Die phänotypischen Unterschiede von Zellen und deren Antwort und Anpassung an Umwelteinflüsse wird unter anderem durch Regulation der Gentranskription gewährleistet. Zusammengefasst benötigt die Transkriptionsregulation die Integration von fünf Variablen: *cis*-agierende Faktoren (DNA und Chromatin), *trans*-agierende Faktoren (Transkriptionsfaktoren und assoziierte Komplexe), die basale Transkriptionsmaschinerie (inklusive der RNA Polymerase II (Pol II) und TATA-Bindeproteine (TBP)), dreidimensionale Strukturen und Zeit (van Driel et al., 2003). Ein wichtiger Faktor für die Transkriptionsregulation ist der Transkriptionsfaktor CTCF, der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.1 Das Multitalent CTCF

Der Transkriptionsfaktor CTCF ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das innerhalb verschiedener Spezies hoch konserviert ist (83-84 % auf Aminosäure (AS)-Ebene bei Vertebraten) (Burke et al., 2002; Lobanenko et al., 1990). Die 727 AS dieses Faktors bilden 3 strukturelle Domänen aus: Die zentrale DNA-Bindedomäne besteht aus 11 Zinkfingern (1 bis 10 vom Typ C₂H₂, 11 vom Typ C₂HC) und wird von 267 AS auf N-terminaler Seite und 150 AS, die den C-terminalen Bereich bilden, flankiert (Abb. 1.1) (Vostrov et al., 2002). CTCF sollte folglich ein Molekulargewicht von 82 kDa besitzen, läuft aber aufgrund bestimmter Sequenzen im N-Terminus nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel einer Laufhöhe entsprechend eines Molekulargewichts von etwa 130 kDa (Klenova et al., 1997). Durch den Einsatz verschiedener Kombinationen von Zinkfingern der hoch konservierten, zentralen Domäne ist CTCF in der Lage, an eine große Anzahl von Zielgenen zu binden. Die Abkürzung CTCF stammt von der Bezeichnung CCCTC-bindender Faktor, da das zuerst identifizierte Bindungselement eine CT-reiche Sequenz aufwies (Klenova et al., 1993). Nach Entdeckung neuer Zielsequenzen wurde jedoch klar, dass die verschiedenen Sequenzen nicht immer CT-reich sind und es darüber hinaus offensichtlich wurde, dass CTCF an keine strikt konservierte Sequenz bindet (Bell and Felsenfeld, 2000; Burcin et al., 1997; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass CTCF an weit über 10.000 Stellen im Mausgenom bindet (Mukhopadhyay et al., 2004). Die N-terminale Domäne ist an der Repression und Aktivierung von Transkription beteiligt. Darüber hinaus ist der N-Terminus nach Bindung von CTCF an die DNA für DNA-Biegung verantwortlich, was zu einer unterschiedlichen 3-dimensionalen Struktur und demnach unterschiedlichen Rekrutierung von Cofaktoren führen könnte (Arnold et al., 1996). Die Repressionsdomäne konnte auf 20 AS im N-Terminus eingengt werden, die jedoch keine

Ähnlichkeit zu bereits bekannten Motiven für die Rekrutierung von Corepressoren aufweist (Druempel et al., 2004). Auch der C-terminale Bereich bindet Faktoren, die an Genreprimierung beteiligt sind und ist darüber hinaus ein Ziel von posttranslationalen Modifikationen (Klenova et al., 2001).

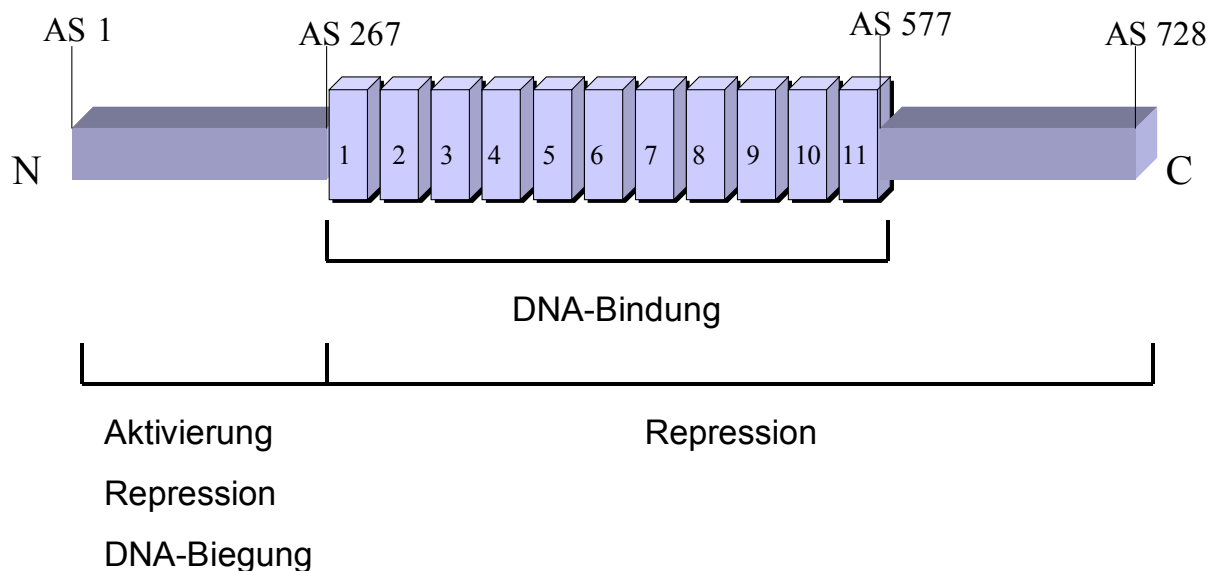


Abb. 1.1: Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors CTCF.

Schematische Darstellung von CTCF. Das CTCF-Protein kann strukturell in drei Bereiche eingeteilt werden. Die zentrale DNA-Bindedomäne, die 11 Zinkfinger beinhaltet, und als nummerierte Boxen dargestellt sind, umfasst die AS 268 bis 576. Der N-Terminus (AS 1 bis 267) ist an Genaktivierung, -repression und DNA-Biegung beteiligt. Die C-terminale Domäne des CTCF-Gens beinhaltet die AS 577 bis 728 und ist ebenfalls an der Repression von Zielgenen beteiligt.

Es ist bekannt, dass CTCF DNA-Sequenzen innerhalb von Promotoren, Silencern und Isolatoren bindet. Ursprünglich wurde CTCF als Repressor des Hühner-Onkogens *c-myc* und des Lysozymgens entdeckt (Baniahmad et al., 1990; Burcin et al., 1997; Lobanenko et al., 1990). CTCF interagiert mit reprimierenden, regulatorischen Sequenzen stromaufwärts dieser Gene und führt so zu einer Herabsetzung der Transkriptionsaktivität. CTCF spielt nachweislich bei wichtigen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. So ist CTCF an der Entwicklung des Auges beteiligt. CTCF kontrolliert hier die Pax6-Expression indem es mit einem Repressorelement stromaufwärts des Pax6 P0 Promotors interagiert. Pax6 spielt eine dominierende Rolle in der Entwicklung des Augapfels und führt zu Zelldifferenzierung (Li et al., 2004). Des Weiteren zeigen neue Studien, dass eine durch CTCF vermittelte Repression an der Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) beteiligt ist. CTCF bindet an die proximale Exonregion und vermittelt Repression durch einen Zell- und Promotor-unabhängigen Mechanismus (Renaud et al., 2005). Die Transkription von hTERT wiederum ist in den allermeisten Tumoren relativ zu seiner normalen Expression stark erhöht (Kim et al., 1994).

Darüber hinaus kann CTCF auch zu einer Aktivierung der Genexpression führen, wie es bisher aber nur für das humane Amyloid β -Protein Precursor (APP) Gens gezeigt wurde, das in der Alzheimer Erkrankung involviert ist. CTCF bindet an eine Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstarts und vermittelt eine erhöhte APP-Genexpression als Antwort auf TGF β (Burton et al., 2002; Vostrov and Quitschke, 1997).

Eine weitere wichtige Funktion, die durch CTCF vermittelt wird, ist die Blockierung von Enhancern, die eine Absenkung der Genaktivität zur Folge hat. Auf diesen Aspekt wird im Folgenden näher eingegangen.

Die hohe Konservierung von CTCF führte zu der Annahme, dass CTCF auch an zentralen, zellulären Funktionen beteiligt ist. In der Tat wurde festgestellt, dass CTCF an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt ist. Die Überexpression von CTCF führt zu einem Stopp im Zellzyklus (in allen Stadien des Zellzyklus) ohne jedoch Apoptose einzuleiten. Diese allgemein reprimierende Funktion von CTCF auf die Zellteilung könnte erklären, wieso in manchen Krebsarten (Wilm's Tumor, Brustkrebs) CTCF-Mutanten anzufinden sind. Diese Mutationen betreffen ausschließlich die Zinkfinger-Domäne und verringern die Bindung an Gene, die normalerweise an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind (z.B. *myc* und *Igf2*).

Jedoch sprechen andere Erkenntnisse über CTCF gegen einen Tumorsuppressor. Die Untersuchung von Brustkrebszellen und -tumoren zeigte, dass hier erhöhte Proteinlevel von CTCF zu finden sind. Normalerweise führt der Prozess der Tumorentwicklung zu einer Unterdrückung von Tumorsuppressoren. Weitere Ergebnisse führen zu der Annahme, dass CTCF anti-apoptotische Eigenschaften aufweist, was wahrscheinlich auf die negative Regulierung apoptotischer Gene zurückzuführen ist (Docquier et al., 2005).

Darüber hinaus ist CTCF auch in die Regulation der X-Inaktivierung involviert. In weiblichen Säugetierzellen kontrolliert das sogenannte X-Inaktivierungszentrum, das zwei nichtkodierende Gene, *Xist* und seinen Antisense-Gegenspieler *Tsix*, umfasst, die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosome. *Xist* wird vom inaktiven X-Chromosome exprimiert und ist für die Aufrechthaltung des inaktiven Status verantwortlich, wohingegen *Tsix* vom aktiven X-Chromosom exprimiert wird. Da in der Kontrollregion des murinen *Tsix* Gen durch Chromatin-Imunopräzipitation(ChIP)-Analysen mehrere CTCF-Bindestellen identifiziert wurden, wird vermutet, dass CTCF einerseits die Aktivierung des *Xist*-Promotors blockiert und andererseits die *Tsix*-Expression aktiviert, was zu einer Aktivierung des X-Chromosoms führt (Chao et al., 2002).

Auch in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus wird CTCF unterschiedliche Funktionen zugeschrieben, da CTCF eine dynamische, Zellzyklus-abhängige Lokalisation aufweist (Zhang et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass CTCF in der Interphase ein Kernprotein ist, das weitgehend vom Nukleolus ausgeschlossen ist. Während der Mitose ist

CTCF dann mit den Centrosomen assoziiert, zum Ende der Mitose (Telophase) dissoziiert CTCF wieder von den Centrosomen und befindet sich in den *Midbodies* und dem neugeformten Zellkern. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CTCF mit mitotischen Chromosomen assoziiert ist. Im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren bleibt die spezifische Bindung von CTCF an Zielgenen auch in der Mitose erhalten und propagiert so den epigenetischen Status der Zelle durch die Mitose (Burke et al., 2005).

| Bindestelle | Wirkung | Referenz |
|--|--|---|
| Humanes c-myc-Gen : Bindestelle N (-2,1 kb) Bindestelle A (+180bp) | Repression Repression (RNA Pol II Pausierungsstelle) | V. Lobanenko, nicht publiziert |
| Hühner-Lysozymgen: F1 -2,4 kb | Repression, Enhancer- Blockade | (Bell et al., 1999; Burcin et al., 1997) |
| Humanes APP β -Gen : APB β -110 bis -75 bp | Aktivierung | (Vostrov and Quitschke, 1997) |
| hTERT: Proximale Exon-Region | Repression | (Renaud et al., 2005) |
| Pax6-Gen: Element 5`des Pax6 P0- Promotors | Repression; Regulation der Augenentwicklung | (Li et al., 2004) |
| ICR des H19/Igf2-Locus : zwischen H19- und Igf2- Genen | Enhancer-Blockade, <i>Imprinting</i> | (Hark et al., 2000) |
| Murines Tsix-Gen: Kontrollregion | Repression (Xist) Aktivierung (Tsix) | (Chao et al., 2002) |
| Hühner β -Globin-Gen: 5`HS4, 5`Ende | Enhancer-Blockade | (Bell et al., 1999) |
| Humaner DM1 Locus: Zwischen DMPK- und SIX5- Genen | Isolation | (Filippova et al., 2001) |
| Element 144 der Ratte: 3`UTR | Repression | (Awad et al., 1999) |

Tab. 1: Übersicht über ausgewählte CTCF-Zielgene und der Einfluss der CTCF-Bindung auf die Transkription.

Posttranslationale Modifizierungen könnten die durch CTCF vermittelten Funktionen kontrollieren. So ist z.B. bekannt, dass die durch CTCF verursachte Repression des c-myc-Gens durch Phosphorylierung von vier Serinen im C-Terminus verändert wird. Mutation dieser AS führte zu einer signifikanten Verstärkung der transkriptionellen Repression des Promotors, ohne jedoch die Kernlokalisierung oder DNA-Bindung von CTCF zu beeinflussen (Klenova et al., 2001).

Des Weiteren kann die Poly(ADP)-Ribosylierung (PARlierung) von CTCF ebenfalls dessen Funktion beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass die PAR-Polymerase (PARP-1) CTCF durch Übertragung mehrere Ribose-Einheiten *in vivo* modifiziert (Yu et al., 2004). Weitere Studien führten zum Nachweis, dass diese posttranslationale Modifizierung für den Vorgang der CTCF-vermittelten Enhancer-Blockade notwendig ist (Yu et al., 2004). Kürzlich wurde darüber hinaus gezeigt, dass die PARlierte Form von CTCF im Nukleolus von differenzierten oder apoptotischen Zellen anzutreffen ist und dort die nukleoläre Transkription inhibiert (Torrano et al., 2006).

Studien innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass CTCF darüber hinaus von den Histon-Acetyltransferasen (HATs) p300 und pCAF zumindest *in vitro* acetyliert werden kann. Die funktionelle Bedeutung dieser Modifikation von CTCF auf z.B. Zellwachstum oder Enhancer-Blockade ist Gegenstand aktueller Untersuchungen (Jörg Leers, nicht publiziert).

Neuere Studien haben einen CTCF-Interaktionspartner identifiziert, der ebenfalls in der Lage ist, die Aktivität von CTCF zu modulieren. Der Transkriptionsfaktor Kaiso, welcher der Familie der POZ-Zinkfinger angehört, interagiert direkt mit CTCF und bindet in der 5' Beta-Globin-Region neben CTCF. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieser Bindestelle die Fähigkeit von CTCF, Enhancer zu blockieren, reduziert (Defossez et al., 2005).

Somit ist CTCF ein bemerkenswert multivalenter Transkriptionsfaktor, der in vielen kritischen Regulationsvorgängen der Zelle involviert ist (Tab.1) und durch eine Vielzahl von Mechanismen moduliert wird. Auf die für eine geregelte Genexpression unerlässliche Enhancer-Blockade, die ebenfalls durch CTCF vermittelt wird, wird in den nächsten Abschnitten genauer eingegangen.

1.2 Isolatoren unterteilen das Genom in funktionelle Bereiche

Viele Studien haben gezeigt, dass das eukaryontische Genom in funktionell autonome Domänen unterteilt ist, in denen Genexpression entweder reprimiert oder erleichtert wird. Es ist mittlerweile bekannt, dass die Chromatinstruktur eine wichtige Rolle in der Regulation der Gentranskription ausübt, indem sie die richtige Umgebung und Bindestellen für Regulatoren bereitstellt und somit die räumlich und zeitlich geeignete Genexpression gewährleistet.

Isolatoren sind DNA-Elemente, welche die Aktivierung von Promotoren durch Enhancerwirkung verhindern und (oder) die Ausbreitung von Heterochromatin stoppen (Abb.1.2). Die Barrierefunktion eines Isolators schirmt das Transgen von Positionseffekten ab und verhindert so die Ausbreitung von reprimierendem Chromatin. Wenn ein Isolator zwischen Enhancer und Gen lokalisiert ist, kann er die Enhancer-Promotor-Interaktion verhindern (Capelson and Corces, 2004). Bis heute existieren mehrere Modelle, welche die Isolatoraktivität zu erklären versuchen. Für viele dieser Modelle gibt es Hinweise, aber ein eindeutiger Beweis für ein einziges Modell fehlt. Es wird z.B. vermutet, dass Isolatoren durch Formierung eines Proteinkomplexes wirken, der ein Signal, das entlang der DNA vom Enhancer zum Promotor wandert, blockiert (Bell and Felsenfeld, 1999). Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass Enhancer und Promotor über den DNA-Strang miteinander kommunizieren. Eine andere mögliche Erklärung für Isolatoraktivität involviert die Ausbildung von DNA-Schleifen. Isolatoren könnten miteinander interagieren und unabhängige Chromatindomänen formieren, die ein oder mehrere Gene beinhalten (Bell and Felsenfeld, 1999). Die Interaktion könnte auch zwischen Isolatoren und der nukleären Matrix erfolgen (Bonifer et al., 1991). Ein Hinweis hierfür sind biochemische Analysen, die zeigen, dass CTCF mit der nukleären Matrix assoziiert ist (Dunn et al., 2003) (Ru Zhang, nicht publiziert). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich neben dem Isolator stromaufwärts des humanen Apolipoprotein B-Gens eine *nuclear matrix attachment region* (MAR) befindet. Es wird vermutet, dass dieses strukturelle Element zur Ausbildung von Chromatinschleifen benötigt wird (Antes et al., 2001).

Bislang wurde viele Isolatoren in verschiedenen Spezies identifiziert, die entweder beide Eigenschaften als Enhancer-Blocker und Barriere aufweisen oder Isolatoren, deren beide Fähigkeiten voneinander trennbar sind (West et al., 2004). Der erste detailliert charakterisierte Isolator in Vertebraten war *chs4*, der im Bereich des 5'Ende des Hühner β -Globin-Locus lokalisiert ist. Die Enhancer-Blockade- und Barriere-Aktivität des *chs4* Elements sind voneinander trennbar, da verschiedene Proteine die jeweilige Funktion ausüben. Der bHLH-ZIP Transkriptionsfaktor USF hat einen Einfluss auf die Barrierefunktion, während die Bindung von CTCF an den Isolator ausreicht, um die Blockade eines Enhancers zu vermitteln. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

1.3 CTCF vermittelt die Blockade von Enhancern

Bisher ist CTCF das einzige Protein in Säugetieren, das die Blockade von Enhancern vermitteln kann, indem es an einen Isolator bindet, der sich zwischen Enhancer und Promotor befindet. Die Blockade von Enhancern kann konstitutiv oder regulierbar sein. Ein Beispiel für eine konstitutive Enhancer-Blockade ist der bereits erwähnte Hühner- β -Globin-

Locus. Eine Regulierung der Enhancer-Blockade hingegen kann z.B. durch die Methylierung von CTCF-Bindestellen vermittelt werden, da CTCF oftmals nicht in der Lage ist, an methylierte Elemente zu binden (Kanduri et al., 2002a). Dies trifft z.B. auf die *Imprinting control region* (ICR) oder *Differentially methylated region* (DMR) des Igf2/H19-Locus zu. Die Expression der Gene Igf2 und H19 erfolgt jeweils nur vom paternalen und maternalen Allel, was als genomische Prägung (*Imprinting*) bezeichnet wird. Während der Gametogenese wird das maternale und paternale Allel in unterschiedlichem Maße methyliert. Dies führt zu einer unterschiedlichen Expression der Gene während der Embryogenese. An diesem *Imprinting* beteiligt ist die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade. Die Allel-spezifische Expression der H19- und Igf2-Gene wird durch die ICR, die -2 bis -4,4 kb relativ zum Transkriptionsstart des H19-Gens liegt, reguliert. Es wurde nachgewiesen, dass die ICR durch Bindung von CTCF als Isolator auf dem maternalen Allel wirkt. Die Bindung von CTCF verhindert die Aktivierung des maternalen Igf2-Promotors durch die stromabwärts vom H19-Gen positionierten Enhancer. Auf dem paternalen Chromosom ist die ICR in hohem Maße methyliert, CTCF kann daher nicht binden und es wird folglich keine Enhancer-Blockade ausgeübt. Dies hat zur Folge, dass der paternale Igf2-Promotor zugänglich für den Enhancer und aktiv ist (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Holmgren et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit der nicht-konstitutiven Enhancer-Blockade stellt die Hormonregulierung auf kombinierten CTCF/TR-Bindestellen dar, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

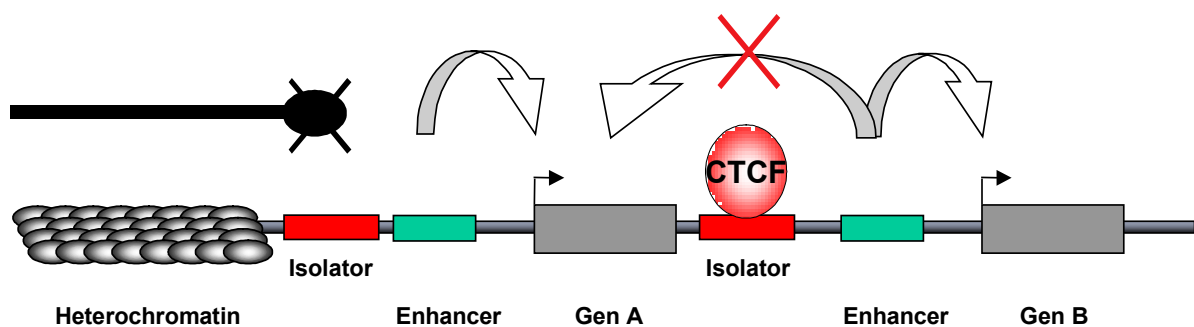


Abb. 1.2: CTCF vermittelt die Blockade von Enhancern.

Schematische Darstellung der Enhancer-Blockade im Genom. Gene sind als graue Balken dargestellt, auf die Enhancer in verschiedene Richtungen wirken können (Pfeile). Auch die Ausbreitung von Heterochromatin kann Genaktivität beeinflussen (schwarze Kelle). Die Anwesenheit von Isolatoren verhindert zum einen die Ausbreitung des Heterochromatins (schwarzes Kreuz) und zum anderen durch Bindung von CTCF die aktivierende Wirkung von Enhancern (rotes Kreuz) auf Gen A, jedoch nicht auf Gen B.

1.4 Thyroidhormon kann die Enhancer-Blockade beeinflussen

CTCF-Bindestellen sind oft in der Nachbarschaft zu Bindestellen für den Thyroidhormon-Rezeptor (TR) zu finden (Arnold et al., 1996; Awad et al., 1999; Lutz et al., 2000a; Lutz et al., 2003; Perez-Juste et al., 2000; Vostrov and Quitschke, 1997). Der Transkriptionsfaktor TR ist ein Mitglied der Kernhormon-Rezeptoren (NHR), die als Monomer oder Dimere an *hormone response elements* (HRE) binden, dessen Halbseiten in Palindromen, invertierten Palindromen oder *Direct Repeats* (DR) zueinander orientiert sind (Claessens and Gewirth, 2004). Nach Bindung an Promotoren können Kernhormon-Rezeptoren die Transkription durch Rekrutierung von Cofaktoren beeinflussen. TR bindet häufig zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an die *Thyroid hormone response elements* (TRE), die in sogenannte positive und negative Elemente eingeteilt werden. Das Hormon Trijodthyronin (T₃) ist ein Ligand für das TR/RXR-Heterodimer und kann in der C-terminalen Liganden-Bindedomäne (LBD) des TR binden. In der Abwesenheit von Hormon, können TR und RXR die basale Aktivität eines Promotors, der ein positives TRE enthält, reprimieren. Die Zugabe von Ligand kehrt die Genreprimierung um und führt zu einer starken Stimulierung dieses Gens (Baniahmad et al., 1990; Brent et al., 1989; Damm et al., 1989). Dies basiert auf einem Austausch der Corepressor-Komplexe mit Coaktivator-Komplexen in der Anwesenheit von Hormon (McKenna and O'Malley, 2001). Im Gegensatz zur positiven Genregulation werden Gene, die ein negatives TRE enthalten, durch die Anwesenheit von T₃ reprimiert (Oppenheimer et al., 1987).

Die Kombination von CTCF- mit nahegelegenen TR-Bindestellen ist z.B. für den Hühner-Lysozym-Silencer und das humane c-myc-Gen bekannt. Innerhalb dieser beiden Elemente wurden funktionelle TREs identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von CTCF und TR eine synergistische Reprimierung in der Abwesenheit von Hormon vermittelt wird, während die Anwesenheit von T₃ zu einer synergistischen Aktivierung führt (Lutz et al., 2000a). Darüber hinaus zeigten Studien mit den kombinierten CTCF/TR-Bindestellen des Hühner Lysozymgens und des humanen c-myc-Gens, dass T₃ die Enhancer-Blockade, die ebenfalls durch diese Elemente vermittelt wird, aufheben kann (Abb. 1.3) (Arnold et al., 1996; Lutz et al., 2003). Ursache dafür ist jedoch nicht der Verlust der CTCF-Bindung, was mittels Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) am Hühner-Lysozymgen gezeigt werden konnte (Lutz et al., 2003). Es wurde auch beobachtet, dass die Histon H4-Acetylierung im Bereich der CTCF-Bindestelle in Anwesenheit von T₃ signifikant ansteigt. Diese mit der Aufhebung der Enhancer-Blockade zunehmenden Acetylierung tritt nicht nur im Bereich der Bindestelle, sondern auch am Enhancer und Promotor auf (Lutz et al., 2003).

Somit bietet die Kombination von CTCF-Bindestellen mit TREs eine weitere Möglichkeit der regulierbaren Enhancer-Blockade, da diese durch Anwesenheit von Hormon aufgehoben werden kann.

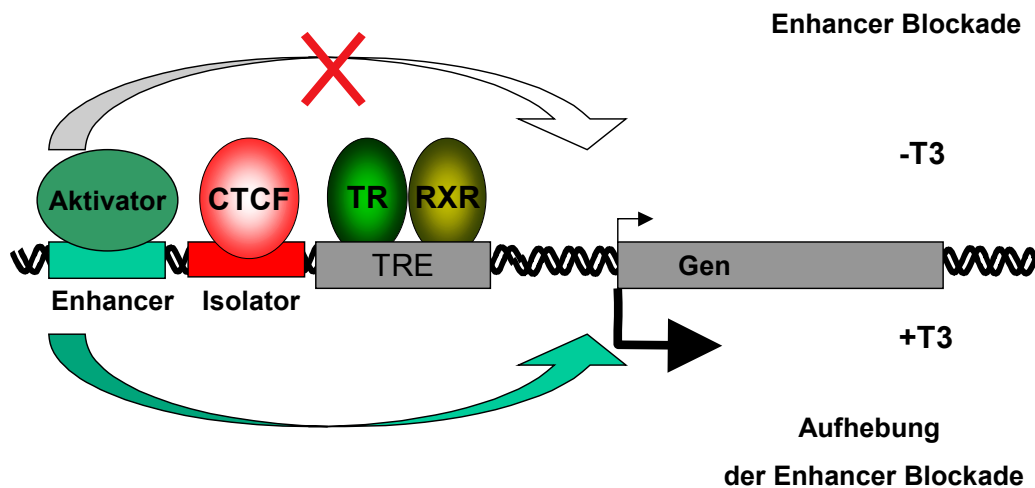


Abb. 1.3: T3 kann die Blockierung von Enhancern aufheben.

Schematische Darstellung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade. CTCF und das TR/RXR-Heterodimer binden an einen Isolator und ein benachbartes TRE. Dadurch wird die Aktivierung eines Enhancers auf ein Gen verhindert (rotes Kreuz) und das Gen wird kaum exprimiert. Die Anwesenheit von T3 führt zur Aufhebung der Enhancer-Blockade (grüner Pfeil) und somit zur Steigerung der Genexpression.

Auch für eine Reihe anderer CTCF-Zielgene wurden benachbarte TREs identifiziert (Abb. 1.4): Ein genomisches DNA-Element der Ratte (Element 144) enthält in Nachbarschaft einer CTCF-Bindestelle ein negatives TRE, das in der Anwesenheit von Thyroidhormon transkriptionelle Repression vermittelt (Awad et al., 1999). Ein weiteres Beispiel einer kombinierten CTCF/TR-Bindestelle ist die CTCF-Bindestelle A, stromaufwärts des murinen c-myc-Gens, die von einem TRE flankiert wird. Dieses Element vermittelt ebenfalls negative Transkription in Anwesenheit von T3 (Perez-Juste et al., 2000).

Interessante Ergebnisse stammen in diesem Zusammenhang auch von der ICR des H19/Igf2-Locus. Mittels *Footprint*-Analyse wurden in dieser Region Sequenzen außerhalb der CTCF-Bindestellen untersucht. In murinen, primären Embryo-Fibroblasten, die nur die maternale oder paternale ICR tragen, wurden 5 *Footprints* identifiziert, die spezifisch für das maternale Allel sind. Jedes dieser *Footprints* umfasste mindestens zwei hexamere Bindestellen für Kernhormon-Rezeptoren und befand sich jeweils neben einer CTCF-Bindestelle. Es konnte gezeigt werden, dass die identifizierten Sequenzen Komplexe binden, die den RXR α und Östrogenrezeptor β (ER β) beinhalten. Wenn Keimzellextrakt von Föten

verwendet wird, der zu einem Zeitpunkt isoliert wurde, an dem die unterschiedliche Methylierung der ICR stattfindet, wird beobachtet, dass die *Footprint*-Sequenzen die Rezeptorkomplexe nur dann binden, wenn der Extrakt von männlichen Keimzellen stammt (Szabo et al., 2004). So schien das Zusammenspiel von CTCF und Kernhormonrezeptoren sich nicht nur auf den TR/RXR-Heterodimer zu beschränken und neben der regulierbaren Enhancer-Blockade eventuell auch an der Etablierung des *Imprinting* beteiligt zu sein. Dies war besonders interessant, da bekannt ist, dass CTCF für die Weitergabe des *Imprintings*, jedoch nicht für die Etablierung des Methylierungsmusters benötigt wird (Pant et al., 2003; Schoenherr et al., 2003; Szabo et al., 2004). Jedoch zeigten neuere Studien, dass die Mutagenese der potentiellen NHRs zu keinem Unterschied in der Etablierung des *Imprinting*-Musters führt (Szabo et al., 2006). Somit bleibt die Bedeutung der Rezeptorbindestellen in der Nachbarschaft zu CTCF-Bindestellen in der murinen ICR noch unklar.

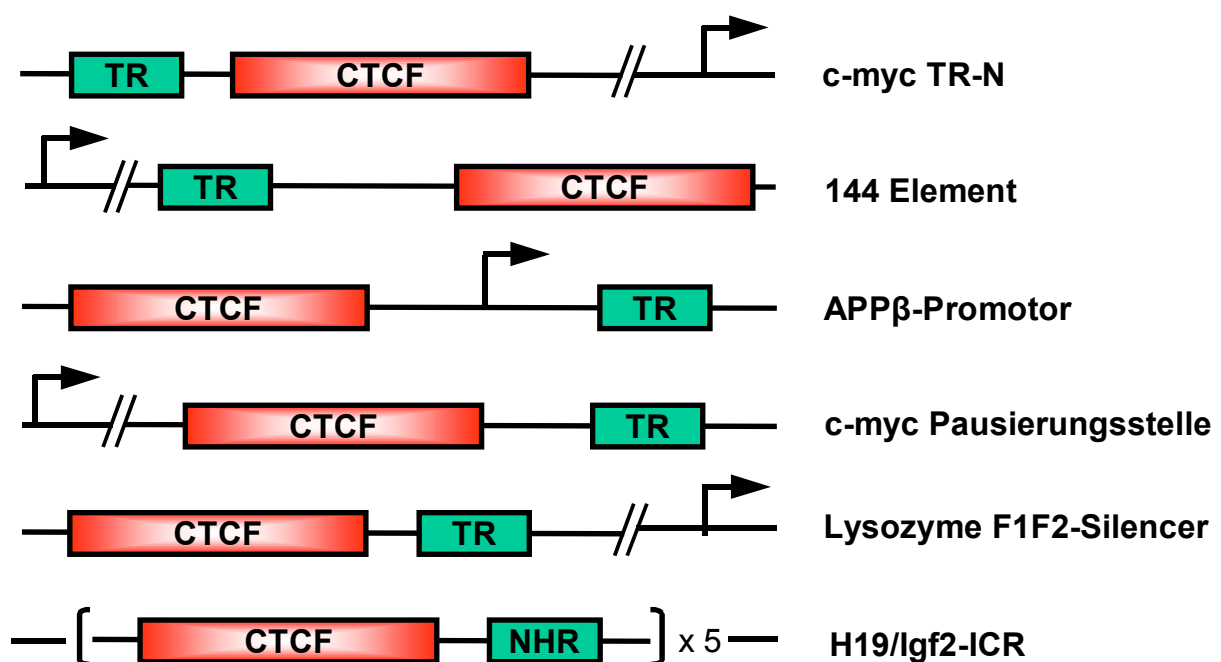


Abb. 1.4: Übersicht über ausgewählte CTCF/NHR kombinierte Bindestellen.

Schematische Darstellung der kombinierten Bindestellen. CTCF-Bindestellen sind als rote Balken, Bindestellen für NHRs als grüne Balken gekennzeichnet. Ein schwarzer Pfeil markiert den Transkriptionsstart.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Einer der wichtigsten Aspekte an CTCF ist seine Funktion als Enhancer-Blocker, die es ermöglicht, bestimmte Regionen des Genoms von Einflüssen durch Enhancer abzuschirmen. CTCF-Bindestellen befinden sich häufig in enger räumlicher Nähe zu einer Bindestelle für den TR. Für das Hühner-Lysozymgen und das humane c-myc-Gen wurde gezeigt, dass beide Module eine funktionelle Einheit bilden, da sie nur zusammen die Expression eines Reportergens synergistisch reprimieren können. Das Vorhandensein von isolierenden DNA-Elementen, die durch CTCF gebunden werden, ermöglicht einen Einblick in den Mechanismus der promotor-spezifischen Aktivierung durch Enhancer-Elemente, deren Einfluss auf diese Weise auf bestimmte Genpromotoren beschränkt bleibt. Ziel dieser Arbeit war es, ein episomales System zu etablieren, in dem die Mechanismen der hormonsensitiven Enhancer-Blockade untersucht werden können. Eine wichtige Aufgabe war die Charakterisierung der individuellen Einflüsse von CTCF und TR auf die hormonsensitive Enhancer-Blockade. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob Chromatin-Modifikationen existieren, welche die hormonsensitive Enhancer-Blockade kennzeichnen. Ein weiterer Punkt, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurde, war die Charakterisierung der CTCF/TR-Interaktion mittels *in vitro*-Analysen und die Ermittlung der CTCF-Domäne, die für eine hormonsensitive Enhancer-Blockade benötigt wird.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Analysewaage | Janke&Kunkel, Kern, Mettler |
| Autoklav | Bachofer, Tecnomara |
| Autoradiographieverstärkerfolien | DuPont |
| Begasungsbrutschrank | Heraeus |
| Blotapparatur | Pharmacia |
| Bunsenbrenner | Heraeus |
| Computer | PC |
| Einfrierbehälter | Nalgene |
| Eismaschine | Scotsman |
| Elektrophoresekammern | BioRad; Mighty Small, Hoefer; Peqlab |
| Elektroporationsküvetten | Eurogentec |
| Elektroporator-Easyject | Eurogentec |
| Entwicklermaschine | M35 X-Omat Processor, Kodak |
| Filmkassetten | Rego, DuPont |
| Gefrierschränke (-80°C) | Colora, Revco |
| Geigerzähler | Berthold LB1210 B, Bachofer |
| Geltrockner | Geldryer Model 583, BioRad |
| Kühlschränke/Gefrierschränke (-20°C) | Siemens, Bosch, Liebherr |
| Luminometer | SIRIUS, Berthold Detection Systems |
| Magnetrührer | IKA, Janke&Kunkel |
| Mikroliterpipetten | Gilson, Eppendorf |
| Mikroskope | Zeiss |
| Mikrowelle | Privileg 8020, LG Intellrowave |
| pH-Meter | Schott, inoLab |
| Pipettierhilfe | Pipettboy, Integra Biosciences |
| Quarzküvetten | Hellma |
| Reinstwasser-Filteranlage | Millipore |
| Rollinkubatoren | Bachofer |
| Rotator | Neolab rotator 2-117, MAGV |
| Schüttler | Mixer 5432, Eppendorf |
| Sonifier | B12, Branson |
| Spannungsgeber | Feathervolt 250, Stratagene |
| Spektralphotometer | Ultraspec 3100, Amersham |
| Szintillationszähler | 1600 TR, Packard Bell |

| | |
|------------------------|-------------------------------------|
| Thermocycler | Rotorgene RG-3000, Corbett Research |
| Thermo-Schüttelschrank | Infors, Bellco Glass, Memmert |
| Trockenschränke | Memmert, Bachhofer |
| Tubesealer | Beckmann |
| UV-Transilluminator | Bachofer (366nm), UVP (254nm) |
| Vakuumzentrifuge | Bachofer, Savant |
| Videoanlage | INTAS |
| Vortexer | Janke&Kunkel |
| Wasserbäder | Julabo, Haake, Köttermann |
| Zählkammer | Fuchs-Rosenthal |
| Zentrifugen | Hettich Mikroliter |
| | Heraeus Minifuge RF |
| | Heraeus Cryofuge 20/30 |
| | Beckman J2-MC Kühlzentrifuge |
| | Beckman L-70 und XL 70 |
| Zentrifugenrotoren | Beckman VTI 90 |
| | Beckman Ti 50.2 |
| | Beckman JA 10 |
| | Beckman JA 17 |

2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Einfriergefäße | Cryotube, Nunc |
| Einwegkanülen | Braun |
| Einwegspritzen | Dispomed, Braun |
| Faltenfilter | Ø 240 mm, Schleicher&Schuell |
| Filter (0,45 µm) | Millipore |
| Filtertips | Gilson, Greiner |
| Gaze | Param |
| Glasperlen | Roth |
| Glaspipetten | Brand |
| Handschuhe | Roth, Peppler, Braun |
| Membran | Hybond XL, Amersham |
| Pasteurpipetten | Hirschmann |
| PCR-Gefäße | Biozym |
| Petrischalen/ Gewebekulturschalen | Greiner |
| Photometerküvetten | Ratiolab |
| Pipettenspitzen | Gilson, Greiner, Sarstedt |

| | |
|-------------------------------|------------------------------|
| PVDF-Membran | Immobilon, Millipore |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml | Brand |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml/2,0 ml | Eppendorf |
| Realtime PCR-Gefäße | Corbett Research |
| Röntgenfilme | X-Omat AR, Kodak |
| Rundfilter | Ø 110 mm, Schleicher&Schuell |
| Scalpell | Braun |
| Schraubdeckelgefäße | Sarstedt |
| Sofortbildfilme | Polaroid |
| Sterilfilter | Minsart®, Sartorius |
| Tücher | fusselfrei, Kimberly-Clark |
| Whatman-Papier | 3MM, Whatman |
| Zellkulturschalen, -flaschen | Greiner |
| Zentrifugenröhrchen | Greiner, Falcon, TPP |

2.3 Chemikalien

Es wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (p.a.) verwendet.

| | |
|-----------------------|---------------------|
| 3-ABA | Sigma |
| Acetyl-CoA | Merck |
| Acrylamid | Roth |
| Agar | BD Biosciences |
| Agarose | IBI, Roth |
| AG®1-X8 Resin | BioRad |
| Aktivkohle | Sigma |
| all-trans Retinsäure | Sigma |
| Ampicillin | Merck |
| <i>Anacardic Acid</i> | Larodan |
| APS | Serva |
| ATP | Boehringer Mannheim |
| Auftragspuffer | MBI Fermentas |
| Bactotrypton | Applichem |
| Betain | Sigma |
| β-Mercaptoethanol | Merck |
| Bradford Reagenz | Roth |
| Bromphenolblau | Merck |
| BSA | Roche |

| | |
|--------------------------------|--|
| Caesiumchlorid | Roth |
| Calciumchlorid | Roth |
| Chloramphenicol | Roth |
| Chloroform | Merck |
| 9-cis-Retinsäure | Sigma |
| Coomassie Brilliantblau R-250 | Merck |
| D-Glucose | Merck |
| DEPC | Merck |
| DTT | Sigma |
| DMEM | Gibco |
| DMSO | Serva |
| dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) | MBI Fermentas |
| EDTA-Natriumsalz | Roth |
| EGTA-Natriumsalz | Serva |
| Essigsäure | Merck |
| Ethanol | Merck |
| Ethidiumbromid | 10 mg/ml, Roth |
| Formamid | Fluka |
| FCS | Gibco |
| FuGene 6 | Roche |
| Glucose | Merck |
| Glycerin | Merck |
| Glycogen | Boehringer |
| G418 | Gibco |
| Glycin | Merck |
| Glycogen | Serva |
| HeLa-Kernextrakt | <i>Computer Cell Culture Centre, Mons, Belgien</i> |
| HEPES | Roth |
| Hühnerserum | PAA |
| Hygromycin | PAA |
| IPTG | Applichem |
| Iscove`s DMEM | Gibco |
| Isopropanol | Merck |
| jetPEI™ | Biomol |
| Kalbsthymus-DNA | Boehringer |
| Kaliumacetat | Merck |
| Kaliumchlorid | Roth |

| | |
|---|----------------------|
| Kalium-di-hydrogenphosphat-3-hydrat | Merck |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | Merck |
| Lachssperma-DNA | Sigma |
| Lithiumchlorid | Sigma |
| D-Luciferin | PJK GmbH |
| Magermilchpulver | Fluka |
| Manganchlorid | Merck |
| Magnesiumacetat | Merck |
| Magnesiumchlorid | Serva |
| Magnesiumsulfat | Merck |
| Metafectene TM | Biontex |
| Methanol | Merck |
| MOPS | Sigma |
| NAMP100 Amplify TM | Amersham |
| Natriumacetat | Roth |
| Natrium-Bicarbonat | Serva |
| Natriumbutyrat | Sigma |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdeoxycholat | Roth |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| Natrium-di-hydrogenphosphat Dihydrat | Merck |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | Merck |
| Natriumhydroxid | Roth |
| o-Nitro-phenol- β -Galactopyranosid | Roche |
| NP-40 | Serva |
| Oligonucleotide | Invitrogen |
| PenStrep-Lösung | Gibco |
| Phenol | Roth |
| Piperidin | Merck |
| PIPES | Sigma, Roth |
| PMSF | Sigma |
| Protein A-Agarose | 50 % slurry, Upstate |
| Proteinmarker (6H, 7B) | Sigma |
| Puromycin | Fluka |
| Radiochemikalien | Amersham |
| Rapid hyb buffer | Amersham |
| Roti [®] -Quant | Roth |

| | |
|------------------------------------|------------------|
| RPMI | Gibco |
| Saccharose | Serva |
| Salzsäure | Merck |
| SDS | ultra pure, Roth |
| Select Peptone (Casein Hydrolysat) | Difco |
| Sephadex G50 | Pharmacia |
| Streptomycin | Sigma |
| TEMED | BioRad |
| Tetrazyklin | Serva |
| T3 | Sigma |
| Trichostatin A | Biomol |
| TRIAC | |
| Tris | Merck |
| Triton X-100 | Serva |
| Tween 20 | Roth |
| Xylencyanol | Sigma |

2.4 Enzyme

| | |
|--|-------------------|
| Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIAP) | MBI Fermentas |
| Klenow-Polymerase | MBI Fermentas |
| Lysozym | Boehringer |
| Pfu Polymerase | MBI Fermentas |
| Proteinase K | MBI Fermentas |
| RNAse A | DNase-frei, Sigma |
| Restriktionsendonukleasen | MBI Fermentas |
| Taq-Polymerase | Invitrogen |
| T4-DNA-Ligase | MBI Fermentas |
| T4-Polymerase | MBI Fermentas |
| T4-Polynukleotid-Kinase | Boehringer, NEB |
| Trypsin | Merck |

2.5 Komplettausrüstungen

| | |
|---|----------|
| GFX™ PCR, DNA and Gel band purification-Kit | Amersham |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen |

| | |
|---|-----------------------------|
| SuperScript™ | One-Step RT-PCR, Invitrogen |
| TNT <i>in vitro</i> Transkription/ Translation-Kit | Promega |
| Platinum® SYBR® Green qPCR | |
| SuperMix UDG | Invitrogen |

2.6 DNA-Längenstandardmarker

λ DNA EcoRI/HindIII (MBI)

Fragmentgrößen (bp)

21.227
5.148
4.973
4.268
3.530
2.027
1.904
1.584
1.375
947
831
564
125

pUC19 DNA MspI (MBI)

Fragmentgrößen (bp)

501
489
404
331
242
190
147
111
110
67

2.7 Protein-Molekulargewichtsmarker

6H, ungefärbt (Boehringer)

Größe (kD)

205
116
97
66
45
29

7B, gefärbt (Boehringer)

Größe (kD)

175
116
93
65
57
36
31

2.8 Oligonukleotide

Klonierungs-Oligonukleotide

- pREPH19-F1F2 und pREPH19-F2F2
S3 5`CAG GCT ACT GGC ATG GAT TGA TTA CA 3`
A3 5`CCT CAT TTC TTC CAT GTT GGT G 3`
2nd S3 5`GCT GCA TTT GAC ATG AAG AAA 3`
2nd A3 5`GCC TGA GAG ACC TGA GTT CG 3`

- pREP-APP
APPCTSTREMonoS 5' TTT AGA TCT GGT TCA CCT TCT CCC GAT TG 3'
APPCTSTREMonoAS 5' TTT CTG CAG AGC CGG CAG AGT CAG CTG AT 3'
- pREP-4xAPP
APPCTSTREMultiS 5' TTT ACT AGT GGT TCA CCT TCT CCC GAT TG 3'
APPCTSTREMultiAS 5' TTT TCT AGA AGC CGG CAG AGT CAG CTG AT 3'
- pREP-APPmut
APPmut1S 5' TCG GGC GCA GCA CCC CGA GGC TCC 3'
APPmut1AS 5' GCA GCC TCG GGG TGC TGC GCC CGA 3'
APPmut2S 5' GGC TCC GCT TCG GGT CTC TGT CGG GTG 3'
APPmut2AS 5' CAC CCG ACA GAG ACC CGA AGC GGA GCC 3'
- pcDNA3-hRAR α
hRARaS 5' TTT GAA TTC GCA TGG CCA GCA AC 3'
hRARaAS 5' TTT CTC GAG TCA CGG GGA GTG GG 3'
- pcDNA3-hRXR α
hRXRaS 5' TTT GAA TTC TCG CAG ACA TGG ACA C 3'
hRXRaAS 5' TTT CTC GAG CTA AGT CAT TTG GTG C 3'
- pGAL-CTCFNTZF1-4 und pGAL-CTCFNTZF1-7
CTCFfIS 5' TTT AGA TCT TGA TGG AAG GTG AAG 3'
CTCFNTZF1-4AS 5' TTT AGA TCT TCA GGA ACG GAC GCT 3'
CTCFNTZF1-7AS 5' TTT AGA TCT TCA AAT GTA GGA ATG 3'
- pGEX-hRXRaNT
hRXRaS 5' TTT GAA TTC TCG CAG ACA TGG ACA C 3'
hRXRaNTAS 5' TTT CTC GAG CTA GAT GTG CTT GGT GAA GGA 3'
- pGEX-hRXRaDBD
hRXRaDBDS 5' TTT GAA TTC ATG TGC GCC ATC TGC GGG GAC 3'
hRXRaDBDAS 5' TTT CTC GAG CTA GGT CGA CTC CAC CTC ATT 3'
- pGEX-hRXRaLBD
hRXRaCTs 5' TTT GAA TTC ATG AGC AGC GCC AAC GAG GAC 3'
hRXRaAS 5' TTT CTC GAG CTA AGT CAT TTG GTG C 3'
- pGEX-hTRbDBD und pcDNA3-TR DBD
hTRbDBDs 5' TTT GAA TTC ATG TGT GTA GTG TGT GGT GAC A 3'
hTRbDBDas 5' TTT CTC GAG CTA CAA ATC TGT TGC CAT GCC 3'
- pGEX-hTRbLBD
hTRbCTs 5' TTT GAA TTC ATG GTG CTG GAT GAC AGC AAG 3'
hTRbAS 5' TTT CTC GAG CTA ATC CTC GAA CAC T 3'

Primer zum Sequenzieren

- Sequenzierung von F1F2 in pBsk
3PRIMEFII 5'GCC TGA GAG ACC TGA GTT CG 3'
5PRIMEFI 5'GCT GCA TTT GAC ATG AAG AAA 3'
- Sequenzierung von Inserts in der MCS des pREP4
pREPMCSUP 5'GCC TAT GAA TAT GAA ATG GTG CC 3'
pREPMCSDOWN 5'TAT CAT GTC TGG ATC CGG CC 3'
pREPseq 5'AAA GCA AGT AAA ACC TCT AC 3'
- Sequenzierung von Inserts in pABgal
Gal94seq 5' CTA CTG ATT TTT CCT CGA G 3'
- Sequenzierung von Inserts in pGEX4Tavi
pGEX5p 5'CTG GTT CGG CGT GGA TCC CGG GA 3'
- Sequenzierung von Inserts in pCDNA3
T7 pCDNA3 5'TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AG 3'

Primer für die ChIP-Analyse

- Primer für endogenes myc CTCF/TR Element
ArandaS 5'AAG CTT TTC GGG CGT TTT TTT CTG 3'
ArandaAS 5' GCT GAT GTT GGG TCA GTC GCA GGG 3'
- Primer für endogene APP CTCF/TR Bindestelle
GomezS 5'CCC TGG AAC CTT AAC GTC CT 3'
GomezAS 5'ACA GAG ACC CCT AGC GGA GC 3'
GomezSneu 5'CCC TGG AAC CTT AAC GTC CT 3'
GomezASneu 5'ACA GAG ACC CCT AGC GGA GC 3'
- Primer 500 bp stromabwärts von APPCTS/TRE
APPcontrolS 5'CTT GGT GTC TGA AGC CAC AT 3'
APPcontrolAS 5'TTC TTC CTG GAA CTC TGC TC 3'
- Primer für β -Actin
ActbconS 5'AGC TTC TTT GCA GCT CCT TCG TTG C 3'
ActbconAS 5' TTC TGA CCC ATT CCC ACC ATC ACA C 3'
- Primer für pREPF1F2 Isolator
pREPF1F2s 5'CTG CAT TTG ACA TGA AGA AA 3'
pREPF1F2as 5'TTA TGT TTC AGG TTC AGG GG 3'
- Primer für pREPF1F2 SV40-Promotor
ChIPpromS 5'TGC ATC TCA ATT AGT CAG CAA CC 3'
ChIPpromAS 5'CCT CAC TAC TTC TGG AAT AGC TCA G 3'

- Primer für pREPF1F2 stromaufwärts des Isolators
F1F2upS 5`GCT TCG AGC AGA CAT GAT AAG AT 3`
F1F2upAS 5`TCC CCC TGA ACC TGA AAC ATA 3`
- Primer für pREPF1F2 stromabwärts des Enhancers
EnhdownS 5`CTA CGA CAT CTC TGC CCC TTC 3`
EnhdownAS 5`GAG AAC CCC TTT GTG TTT GGT 3`
- Primer für endogenen F1F2 Locus Isolator
chlys-2.54s 5`CTG TTT GAC CAC CAT GGA GTC A 3`
chlys-2.54as 5`TCC GCT AAC TCC TGC TT GC 3`

Primer für Northern-Sonde

- APP
RTAPPaIS 5`GTA CCC ACT GAT GGC AAC GC 3`
RTAPPaIAS 5`GCT TCC ACC ACG TTT GTG ATC 3`
RTAPPs 5` GTT GGC CGA GGA AAG CGA CA 3`
RTAPPas 5`TTC TCT CGG TGG CCT CTT CGT AGG G 3`
- β -Actin
Primer ACTBS 5`AGG CTG TGC TGT CCC TGT AT 3`
Primer ACTBAS 5`TAG CTC TTC TCC AGG GAG GA 3`

Oligonukleotide für Bandshift Assays

- APP CTS
APPCTSs 5` TCG GGC GCA GCT CCC CGA GGC TCC GCT AGG GGT CTC TGT C 3`
APPCTSas 5`GAC AGA GAC CCC TAG CGG AGC CTC GGG GAG CTG CGC CCG A 3`
- APP CTsmut
APPCTSmuts 5` TCG GGC GCA GCA CCC CGA GGC TCC GCT TCG GGT CTC TGT C 3`
APPCTSmutas 5`GAC AGA GAC CCG AAG CGG AGC CTC GGG GTG CTG CGC CCG A 3`
- APP TRE
APPDR5S 5`GAT TGT GGG GTC CTC TCC CTG ACC CAG ATC ACT CCC CAA C 3`
APPDR5AS 5`GTT GGG GAG TGA TCT GGG TCA GGG AGA GGA CCC CAC AAT C 3`

- F1
 Ölle009B 5`CTA GAT GAA GAA ATT GAG ACC TCT ACT GGA TAG CTA TGG TAT
 TTA CGT GTC TA 3`
 Ölle010B 5`AGC TTA GAC ACG TAA ATA CCA TAG CTA TCC AGT AGA GGT CTC
 AAT TTC TTC AT 3`
- F2
 F2S 5`AGC TTT TAG TTA CTT ATT GAC CCC AGC TGA GGT CAG 3`
 F2AS 5`GAT CCT GAC CTC AGC TGG GGT CAA TAA GTA ACT AAA 3`
- F1mut
 F1mut1S 5`CTA GAT GAA GAA ATT GAG ATT TCT ACT GGA TAG CTA TGG TAT
 TTA CGT GTC TA 3`
 F1mut1AS 5`AGC TTA GAC ACG TAA ATA CCA TAG CTA TCG AGT AGA AAT
 CTC AAT TTC TTC AT 3`
- F2mut
 F2mutS 5`AGC TTT TAG TTA CTT ATT GGG TCC AGC TGA TCC CAG 3`
 F2mutAS 5`GAT CCT GGG ATC AGC TGG ACC CAA TAA GTA ACT AAA 3`

2.9 Vektoren

Reporterkonstrukte

- | | |
|-----------------------------|-------------------------|
| • (DR4) ₂ -tkluc | (Dana et al., 1994) |
| • pCMV-LacZ | U. Deutsch, Bad Nauheim |
| • pGL3-Neo-UASF2 | O. Klaus |
| • pGL3-Neo-(4xUAS)F2 | O. Klaus |
| • pGL3-8x(UASF2) | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGL3control | Promega |
| • p3α | F. Rüger, 2001 |
| • p3αΔenh | F. Rüger, 2001 |
| • pGL3control-4xAPP | O. Klaus |
| • pGL3control-4xAPPmut | O. Klaus |
| • pGL3control-F1F2 | O. Klaus, Diplomarbeit |
| • pGL3control-F1mutF2 | O. Klaus |
| • pGL3control-F1F2mut | O. Klaus |
| • pGL3control-5xF1F2 | O. Klaus, Diplomarbeit |
| • pREPH19-A | (Kanduri et al., 2000) |
| • pREPH19-B | (Kanduri et al., 2000) |
| • pREPH19-F1F2 | C. Weth, siehe Anhang |

| | |
|------------------------|-----------------------|
| • pREPH19-F2F1 | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREPH19-TR-N | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREPH19-N-TR | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-luci-enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-luci+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-F1F2-enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-F1F2+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-5x(F1F2)-enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-5x(F1F2)+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-F1mutF2+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-F1F2mut+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-5x(F1mutF2)+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-5x(F1F2mut)+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-4xAPP+enh | C. Weth, siehe Anhang |
| • pREP-4xAPPmut+enh | C. Weth, siehe Anhang |

Plasmide für die bakterielle Expression

| | |
|--------------------------|------------------------------|
| • pGEX1-H2A | C. Wu (Georgel et al., 1997) |
| • pGEX1-H2B | C. Wu (Georgel et al., 1997) |
| • pGEX1-H3 | C. Wu (Georgel et al., 1997) |
| • pGEX1-H4 | C. Wu (Georgel et al., 1997) |
| • pGEX-2T-p300 | S. Berger (Liu et al., 1999) |
| • pGEX-4T1avi-CTCF | J. Leers |
| • pGEX-4T1avi-CTCF Zf | J. Leers |
| • pGEX-4T1avi-hRXRaNT | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGEX-4T1avi-hRXRaDBD | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGEX-4T1avi-hRXRaLBD | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGEX-4T1avi-hTRbDBD | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGEX-4T1avi-hTRbLBD | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGEX-4T1avi-TR β | C. Weth, siehe Anhang |
| • pGEX-4T1avi | J. Leers |
| • pGEX-5X-pCAF | S. Berger (Liu et al., 1999) |
| • pGST-CTCF | H. Greb |
| • pGST-MeCP2 | (Fuks et al., 2003) |

Plasmide für die eukaryontische Expression

- pABgal₉₄linker (Baniahmad et al., 1994)
- pBK-CMV-CTCF NT J. Leers
- pBK-CMV-CTCF ZF J. Leers
- pBK-CMV-CTCF J. Leers
- pcDNA3-hERβ A. Baniahmad
- pcDNA3-Luciferase Promega
- pcDNA3-RXRα C. Weth, siehe Anhang
- pcDNA3-RARα C. Weth, siehe Anhang
- pcDNA6-TR Invitrogen
- pcDNA3-TRDBD C. Weth, siehe Anhang
- pCMX-hLXRα (Willy et al., 1995)
- pEGFP-C2 Clontech
- pGAL-CTCF G. Barreto
- pGAL-CTCF Zf G. Barreto
- pGAL-CTCF NTZf G. Barreto
- pGAL-CTCFNTI L. Burke
- pGAL-CTCFNTZf1-7 C. Weth, siehe Anhang
- pGAL-CTCFNTZf1-4 C. Weth, siehe Anhang
- pRS-hTRβ (Thompson and Evans, 1989)
- pSG5-hRXRα (Barettino et al., 1993)
- pRS-hRARα (Giguere et al., 1987)
- pSG5-hAR A. Baniahmad
- pT7-hTRβ A. Baniahmad, 1991
- pSUP-siRNA2 C. Nordhammer, 2005
- p-Puro Clontech

Sonstige

- pBluescript II SK(+/-) Stratagene
- pBK-CMV Stratagene
- pBK-CMV-5xF1F2 O. Klaus, Diplomarbeit
- pBK-CMV-8xUASF2 C. Paprotka, Diplomarbeit
- pCDNA3 Invitrogen
- pREP4 Invitrogen

- pREP4-ss J. Leers, aus dem kommerziellen Vektor pREP4 wurden der RSV-Promotor und die Polyadenylierungsstelle entfernt
- p(TRN)P2luc T. Awad, 1998

2.10 Antikörper

| | |
|---------------------------------|--|
| Anti-CTCF (c-terminal) | Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Hühner CTCFs gerichtet ist (Dr. Klenova). 1:20.000 in PBS-T für Western Blot 5 µl für ChIP |
| Anti-acetyliertes Histon H4 | Upstate #17-229, 5 µg für ChIP |
| Anti-acetyliertes Histon H3 | Upstate #17-245, 5 µg für ChIP |
| Anti-acetyliertes Histon H3K9 | ack9H3, Upstate #07-352, 5 µg für ChIP |
| Anti-Alien | Goubeaud et al. 1996, 5 µg für ChIP |
| Anti-dimethyliertes Histon H3K9 | dimetK9H3, Abcam ab7312, 5 µg für ChIP |
| Anti-RNA Polymerase II | PolII, Santa Cruz N-20, 5 µg für ChIP |
| Anti-TRα | Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen gerichtet ist, Santa Cruz # sc 772 1:500 in PBS-T für Western Blot |
| Anti-rabbit-HRP | Meerettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline 1:50.000 in PBS-T für Western Blot |
| Präimmunserum | Kaninchen, vor Immunisierung mit anti-dCTCF, 5 µl für ChIP |
| Anti-Gapdh | Polyklonale Kaninchen-Antikörper, 1:5000 in PBS-T für Western Blot |

2.11 Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich Labor-Sicherheitsstämme des Prokaryots *Escherichia coli* K12 benutzt, die zur Konjugation nicht befähigt sind.

BL 21(DE 3) pLys s (Studier et al., 1990)

Dieser Stamm trägt den Genotyp $F^- \text{ompT gal[dmc][lon] hsdS}_{\text{B}}(\text{r}_{\text{B}}^- \text{m}_{\text{B}}^-)$ mit DE3, einem λ -Prophagen, der das IPTG induzierbare T7-Polymerase-Gen trägt. Er besitzt weder lon- noch ompT-Proteasen. Weiterhin enthält er ein Plasmid, welches das T7-Lysozym und die Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert. Er wurde zur Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet.

Escherichia coli XL1-Blue MRF⁻ (Stratagene)

Der Stamm besitzt den Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F^- \text{proAB lacI}^q \Delta \text{M15Tn10 (Tet}^r\text{)}]$.

Er enthält keine der bekannten Restriktionssysteme [$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$], und besitzt keine Endonuklease (*endA*). Es fehlt auch die Fähigkeit zur Rekombination (*recA*). Eine Resistenz besteht gegen Tetracyclin.

2.12 Eukaryontische Zelllinien

COS-1 (ATCC-Nr. CRL-1650)

Hierbei handelt es sich um Affen-Nierenzellen. Die Zelllinie leitet sich von CV-1 Zellen ab. Sie enthält eine integrierte Kopie des SV40-Virusgenoms. Dieses codiert für das T-Antigen. Daher replizieren COS-1 Zellen sehr effektiv solche Plasmide, die einen SV40-Replikationsursprung besitzen. Sie weisen eine fibroblastenartige Morphologie auf und wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie werden in DMEM mit 10% FCS bei 37°C in 5%-iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

NIH3T3 (ATCC Nr. CRL-1658)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um einen Subklon der 3T3 Swiss albino Linie (nicht transformierte embryonale Mausfibroblasten), die beim Erreichen einer konfluenten Zelldichte durch Kontaktinhibition eine Präadipocyten-Adipocyten ähnliche Differenzierung erfährt. Die Zellen wachsen adherent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie wurden in DMEM mit 10% FCS bei 37° C in 5%-iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

N2a (Neuro-2a, ATCC-Nr. CCL-131)

Diese Zelllinie besteht aus Maus-Neuroblastomzellen. Sie weisen die Morphologie von neuronalen und amöboiden Stammzellen auf. Sie wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie werden in DMEM mit 10% FCS bei 37° C in 5%-iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

N2aβ

Die klonale Zelllinie N2a wurde stabil mit der β1 Isoform des humanen TR transfiziert und in DMEM mit 10% FCS kultiviert (Lebel et al., 1994). Durch die stabile Integration besitzen sie ein Hygromycin-Resistenzgen.

HEK-293T (ATCC-Nr. CRL-11268)

HEK-293 Zellen wurden aus primären embryonalen humanen Nierenzellen etabliert, die mit Adenovirus 5 DNA transformiert wurden. 293T Zellen sind ein Derivat der 293 Zelllinie, die zusätzlich ein temperatursensitives Gen für das SV40-Antigen tragen. Sie sind in hohem Maß transfizierbar und replizieren sehr effizient Plasmide, die einen SV40-Replikationsursprung besitzen. Sie wachsen als Monolayer mit epithelialer Morphologie auf Gewebekulturschalen. Sie wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep in 5%-iger CO₂ Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

HEK-293T mit stabil integrierter siRNA gegen CTCF

HEK-293T Zellen wurden stabil mit siRNA gegen CTCF transfiziert. Die Expression der siRNA wurde durch ein Tet-On System reguliert. Stabil integriert wurden daher der Tet-Repressor (pCDNA6-TR) zusammen mit dem siRNA-Expressionsvektor (pSUP-siRNA2) (C. Nordhammer, Diplomarbeit). Die Zellklone wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

HD11

Diese Macrophagen-Zelllinie wurde aus dem Huhn isoliert. Sie exprimiert Lysozym und wird in Iscove`s DMEM mit 8% FCS und 2% *Chicken Serum* kultiviert.

K562 (ATCC-Nr. CCL-243B)

Bei diesen Zellen handelt es sich um menschliche Knochenmarkszellen einer chronisch myelogenen Leukämie. Die Zellen wachsen in Suspension mit lymphoblastenartiger Morphologie. Sie wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37° C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Heterozygote mouse embryonic fibroblasts (MEF)

Es handelt dabei sich um Zellen, die aus Mäuseembryonen stammen und denen sog. lox-Sequenzen am CTCF-Locus eingesetzt wurden (Niels Galjart, Rotterdam). Diese MEF sind heterozygot gefloxt (ein CTCF-Allel besitzt an jedem Ende des CTCF-Gens eine lox-Sequenz). Sie werden in DMEM und F-10 Ham (1:1) mit 10% FCS kultiviert.

Heterozygote MEF mit stabil integrierter Cre-Recombinase

Heterozygote MEF Zellen wurden stabil mit einer Cre-Rekombinase transfiziert, die unter Kontrolle einer Tet-Off Regulation steht. Hierfür wurden die Plasmide für den Tet-Aktivator (pTA-N) und die Cre-Rekombinase (pBI-EGFP-Cre) verwendet (C. Nordhammer, Diplomarbeit). Die stabilen Klone wurden in DMEM und F-10 Ham (1:1) mit 10% FCS kultiviert.

JEG3 (ATCC-Nr. HTB-36)

Diese Zellen wurden aus einem Choriocarcinom der humanen Plazenta isoliert. Sie weisen eine epitheliale Morphologie auf und werden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

2.13 Allgemeine Vorbereitungen

Gelpuffer und Nährmedien wurden ausschließlich mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt, sterile Lösungen durch Autoklavieren oder bei Vorliegen hitzelabiler Komponenten durch Sterilfiltration hergestellt. Die Konzentrationsangaben der Lösungen beziehen sich auf deren Endkonzentration. Glasgeräte wurden autoklaviert oder 4 h bei 180 °C hitzesterilisiert.

3 METHODEN

3.1 Allgemeines Arbeiten mit DNA

3.1.1 Lagerung

Die Lagerung von DNA erfolgte in Wasser oder TE-Puffer bei -20°C oder 4°C.

| | |
|------------------|-------|
| TE-Puffer | |
| Tris/HCl pH 7,6 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

3.1.2.1 Minipräparation

Die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Sie dient der schnellen und einfachen Aufreinigung einer größeren Anzahl von Plasmid enthaltenden Bakterienkolonien. Einzelne Klone wurden von einer Agarplatte isoliert und in 3 ml Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mind. 12 h bei 37°C geschüttelt. Von dieser LB-Übernachtskultur wurden 1,5 ml Bakteriensuspension mit 13.000 rpm für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde die Probe gevortext und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 µl der Lösung 3 dazupipettiert, die Proben anschließend invertiert und die Zelldebris 10 min mit 13.000 rpm bei RT abzentrifugiert. 375 µl des Überstands, der die Plasmid-DNA enthält, wurden vorsichtig abgenommen und kräftig mit 300 µl Isopropanol gemischt. Das Ausfällen der DNA erfolgte durch eine anschließende Zentrifugation für 15 min mit 13.000 rpm bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach restlosem Entfernen des Überstandes durch Trocknen der Proben in der *Speedvac* wurde das Pellet bei RT unter Schütteln für 30 min in 50 µl TE-Puffer mit RNase (20 µg/ml) gelöst. Für Restriktionsverdauungen wurden diesem Ansatz jeweils 3-5 µl entnommen.

| | |
|-----------------|-------|
| Lösung 1 | |
| Glukose | 50 mM |
| Tris/HCl pH 8,0 | 25 mM |
| EDTA | 10 mM |

| | |
|--|-------|
| Lösung 2 | |
| NaOH | 0,2 N |
| SDS | 1% |
| frisch ansetzen, ddH ₂ O vorlegen | |

Lösung 3

Kaliumacetat

24,5 g

Eisessig

35 ml

pH 4,8 einstellen, mit
ddH₂O auf 100 ml
auffüllen**3.1.2.2 Maxipräparation mit CsCl-Dichtegradient**

Zur Aufreinigung größerer Mengen an DNA wurde ebenfalls die modifizierte Bakterienaufschlussmethode nach Birnboim und Doly verwendet. Die Abtrennung der Plasmid-DNA von RNA und genomischer Bakterien-DNA erfolgte mit Hilfe zweimaliger Dichte-zentrifugation in einem CsCl-Gradienten (Radloff et al., 1967). Zu 360 ml TB-Medium wurden 40 ml Phosphat-Puffer, zur Selektion geeignete Antibiotika und Bakterien aus einer Vorkultur gegeben. Nach einer Inkubation von 6-8 h bei 37°C im Schüttelinkubator wurde die Bakterienkultur optional zur Plasmidamplifikation mit 400 µl einer Chloramphenicol-Lösung (34 mg/ml, in Ethanol) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 10-16 h wurden die Zellen für 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 9 ml Lösung 1 resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml Lösung 1 mit 40 mg/ml Lysozym, erneutes Resuspendieren und Inkubation für 5 min bei RT. Nach Zugabe von 20 ml frisch bereiteter Lösung 2 wurde der Aufschluss sehr gut gemischt und für 5-10 min auf Eis inkubiert, was zur DNA-Denaturierung führt. Nach Zugabe von 15 ml Lösung 3, starkem Schütteln und erneuter Inkubation für 10 min auf Eis, erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 5000 rpm und RT. Dieser Schritt dient der Neutralisierung, wobei hauptsächlich Plasmide wieder in Lösung gehen. Der Überstand wurde über einen Faltenfilter zu gleichen Volumenteilen in zwei 50 ml Falcons überführt, mit 0,6 VT Isopropanol (20 min, RT) gefällt und anschließend präzipitiert (20 min, 5000 rpm, RT). Die getrockneten Pellets wurden in je 1,5 ml TE-Puffer durch Schütteln bei 37°C gelöst und wieder in einem Falcon vereint. Dann wurden 4,5 g CsCl zu jeder Probe hinzugefügt und bei 37°C gelöst. Danach wurden 500 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm, bei der große Mengen an Proteinen abgetrennt wurden. Der Überstand wurde in ein Beckmann Quickseal™-Zentrifugenröhrchen (13 x 51 mm) überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde daraufhin mit einer 50%-igen (w/w) CsCl-Lösung oder ddH₂O so aufgefüllt, dass die Probe ein Gesamtgewicht zwischen 9,5 und 9,8 g besaß. Es folgte das Zuschweißen des Zentrifugenröhrchens und die Überführung in einen Vertikalrotor (Vti90). Der erste Gradient wurde durch eine Ultrazentrifugation bei 55000 rpm über Nacht ausgebildet. Bei diesem Schritt trennen sich die Bestandteile nach ihrer spezifischen Dichte im CsCl-Dichtegradienten auf. Die dann sichtbare Plasmid-DNA-Bande wurde mit Hilfe einer

Injektionskanüle und einer Einwegspritze abgesaugt, in ein neues *Quick-Seal*-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 50%-iger CsCl-Lösung (w/w) auf 9,5-9,8 g gebracht und für mindestens 4 h zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde erneut abgezogen, in ein 15 ml Falcon überführt und mit je 2 ml CsCl-gesättigtem Isopropanol überschichtet. Durch intensives Vortexen ging das restliche Ethidiumbromid aus der DNA-Lösung in die obere Isopropanolphase über, die abgenommen und entsorgt wurde. Dieser Vorgang wurde sooft wiederholt, bis beide Phasen klar waren, um dann anschließend die untere Phase noch zweimal mit CsCl-gesättigtem Isopropanol zu überschichten und auszuschütteln. Daraufhin wurde die wässrige Phase mit 2 VT H₂O verdünnt, die DNA durch Zugabe von 0,6 VT Isopropanol und 10-minütiger Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 5000 rpm) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Ausbeute in bis zu 500 µl TE-Puffer gelöst. Die Menge der DNA wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt und die Qualität der Plasmide durch Restriktionsspaltung überprüft.

| | | | |
|------------------|------------|---------------------------------|------------|
| TB-Medium | | Phosphat-Puffer | 10x |
| Select Peptone | 12 g/l | KH ₂ PO ₄ | 0,17 M |
| Hefe-Extrakt | 24 g/l | K ₂ HPO ₄ | 0,72 M |
| Glycerin | 0,4% (v/v) | Autoklaviert | |
| Autoklaviert | | | |

3.1.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Isolierung genomischer DNA wurde zuerst das Medium von den eukaryontischen Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1xPBS gewaschen und daraufhin mittels Trypsin von der Schale abgelöst. Um die Trypsinierung zu stoppen, wurden die Zellen mit Medium versetzt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 1000 rpm geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem 5 – 10fachen Volumen an Extraktionspuffer resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen 3 h bei 55°C inkubiert. Nach dem Abkühlen (ca. 15 min bei RT) wurde ½ VT Phenollösung hinzugegeben, 10 min rotierend inkubiert und mit 1/2 VT Chloroform gemischt. Nach erneutem 10minütigem Rotieren erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, 8000 rpm). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 VT Chloroform versetzt. Es erfolgte wiederum eine rotierende Inkubation für 10 min und eine anschließende Zentrifugation bei 8000 rpm für 10 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und einer Ethanol-Fällung unterzogen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in TE gelöst, wobei die Menge an TE von der Pelletgröße abhängig ist.

Extraktionspuffer

| | |
|-----------------|-----------|
| NaCl | 200 mM |
| EDTA | 100 mM |
| SDS | 0,2% |
| Proteinase K | 100 µg/ml |
| frisch ansetzen | |

3.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Beseitigung von Proteinen aus wässriger DNA-Lösung (Ausubel, 1989). Durch eine darauffolgende Ethanolpräzipitation werden Salze entfernt.

Die wässrige DNA-Lösung wurde zunächst auf ein geeignetes Volumen (mindestens 200 µl) mit ddH₂O aufgefüllt, mit 1 VT equilibriertem Phenol versetzt und mit einem Vortexer gründlich vermischt. Ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm diente der Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge an Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und gut vermischt. Nach erneuter Phasentrennung (10 min, 13.000 rpm) wurde die obere Phase nochmals einer Aufreinigung mit Chloroform unterzogen. Anschließend wurde die wässrige und jetzt proteinfreie Phase zur Fällung der DNA mit 2 VT 100%-igem Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation für 15 min bei –20°C wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm). Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach einer erneuten kurzen Zentrifugation getrocknet. Das Lösen der DNA in TE oder ddH₂O erfolgte für 10 min auf einem Rüttler.

NaAc-Lösung

| | |
|-----------------------|-----|
| Natriumacetat | 3 M |
| pH mit Essigsäure auf | |
| pH 5,0 einstellen | |

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Ausubel, 1989 ; Ausubel F. M., 1989) erfolgte durch Absorbionsmessung bei 260 nm in einer Quarzküvette. Dabei wurde die DNA in ddH₂O verdünnt. Die Konzentration wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$c = OD_{260} \times n \times f$$

- c: Konzentration
n: 50 µg/ ml für dsDNA, 40 µg/ ml für ssDNA und RNA, 30 µg/ ml für Oligonukleotide bei
 1 cm Küvetten-Schichtdicke
f: Verdünnungsfaktor
OD₂₆₀: Optische Dichte bei 260nm

3.2 Enzymatische Modifikation von DNA

Modifikationen von DNA wurden mit Hilfe von Enzymen durchgeführt, die gemäß den Herstellerangaben verwendet wurden.

3.2.1 Restriktionsspaltung

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden (Roberts and Macelis, 1991). Diese Enzyme erkennen eine spezifische Nukleotidabfolge einer doppelhelikalen DNA, an der sie entweder direkt (Typ II Endonukleasen) oder an einem davon entfernten Bereich (Typ I Endonukleasen) schneiden können. Hierbei entstehen überstehende (*sticky*) Enden oder glatte (*blunt*) Enden (Ausubel, 1989). Die Aktivität eines jeden Enzyms ist in *Units* (engl.: Einheiten) angegeben. Ein *Unit* ist die Menge eines Enzyms, die nötig ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen. Im Allgemeinen wurden 2-3 Enzymeinheiten pro µg Plasmid-DNA verwendet und 1-2 h bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Auffüllen von 5'-Enden

Wenn nach Restriktionsverdaus zwei DNA-Fragmente entstanden, deren Enden nicht zueinander komplementär waren, und diese miteinander ligiert werden sollten, war es notwendig, diese Enden durch eine Polymerase-Reaktion zu glatten Enden mit Desoxynukleotiden aufzufüllen. Das hierfür verwendete Enzym war das Klenow-Enzym, das der großen Untereinheit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase I aus *E. coli* entspricht, oder die T4 DNA Polymerase. Diese Enzyme katalysieren die Addition von Desoxynukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe eines DNA-Moleküls, das einen 5'-Überhang besitzt und somit sowohl als Primer als auch als Matrize dient. Ferner besitzt das Klenow-Enzym eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Für das Auffüllen von 5'-Überhängen wurden bis zu 5 µg DNA in 1 x Klenow- oder T4-Reaktionspuffer mit 1 µl eines 25 mM dNTP-Mixes und 10 *Units* Klenow-Enzym oder T4 DNA Polymerase in einem Volumen von 10 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Für 10 µg DNA wurden 10 *Units* Enzym der Firma MBI zusammen mit 4 µl eines 4 mM dNTP-Mixes eingesetzt und für 30 min bei RT inkubiert.

3.2.3 Dephosphorylierung

Die Religationseigenschaft eines Vektors erschwert das Einbringen eines DNA-Fragments in einen linearisierten Vektor, der zwei gleiche Enden aufweist. Die alkalische Kälberdarm-Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) kann diese Religation verhindern, indem es eine hydrolytische Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppen des Vektors bewirkt. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte mit 1 *Unit* Phosphatase pro µg DNA für 2-12 h bei 37°C im dazugehörigen Reaktionspuffer. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym durch Phenol/Chloroform-Extraktion oder Gelelektrophorese von der DNA separiert.

3.2.4 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert ATP- und Mg^{2+} -abhängig die Verbindung von 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen zu Phosphodiesterbindungen (Ausubel, 1989). Bei glatten Enden wurden dabei Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:4 und bei überhängenden Enden 1:2 in Ligase-Puffer mit einem Enzym-*Unit* Ligase pro µg Gesamt-DNA inkubiert. Im Falle kohäsiver Enden erfolgte die Ligation für mind. 3 h bei RT, im Falle glatter Enden über Nacht bei 4°C.

3.2.5 Sequenzierung von DNA

Um Plasmide, die aus einer Minipräparation stammen, zu sequenzieren, musste die DNA zuvor noch einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließenden Ethanol-Fällung unterzogen werden. Plasmide aus einer Maxipräparation konnten direkt verwendet werden. 0,6 µg des zu sequenzierenden Plasmids wurden zusammen mit 20 pmol geeignetem Primer in einem Volumen von 7 µl in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die Sequenzierung wurde von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

3.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren, um spezifische DNA-Fragmente in einer exponentiell verlaufenden Polymerisierungsreaktion zu amplifizieren. Drei wesentliche Komponenten kommen dabei zum Einsatz: eine hitzestabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase, ein Plasmid oder ein DNA-Fragment, das der Polymerase als Matrize dient und schließlich zwei Primer, die komplementär zu den flankierenden Regionen der zu amplifizierenden Sequenz sind, an die sie antiparallel hybridisieren und deren freies 3'-OH Ende der Polymerase als Substrat für die Addition von freien Desoxynukleotiden dient.

Die Reaktionen der PCR erfolgen zyklisch, wobei die Einzelreaktionen der PCR temperaturabhängig sind und in drei Schritten verlaufen. Der Denaturierung bei 94°C, bei der sich die beiden Stränge der DNA trennen, folgt die Hybridisierung der Primer bei 45-65°C an die DNA-Einzelstränge. Die anschließende Elongation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, schließt den Zyklus ab. Für gewöhnliche Amplifizierungen wurde die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Sollten die PCR-Produkte jedoch für Klonierungen dienen, wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da sie eine *Proof Reading*-Aktivität besitzt. Bei der Auswahl von geeigneten Primern wurde darauf geachtet, dass sie eine Länge von 17-28 Nukleotiden im hybridisierenden Bereich und einen GC-Gehalt von 50-60% besaßen. Die Primer sollten am 3'-Ende ein G oder C besitzen und die Schmelztemperaturen (T_m) optimalerweise zwischen 55 und 80°C liegen.

3.2.7 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR wird angewendet, um eine quantitative Echtzeitanalyse von spezifischen DNA-Fragmenten durchzuführen. Die Produktzunahme wird durch Fluoreszenzlicht gemessen, welches in Abhängigkeit zur Produktmenge entsteht. Hierfür wurde der Farbstoff *SYBR Green I* verwendet. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 480nm, das Emissionsmaximum lag bei 520nm. Der Farbstoff bindet sequenzunabhängig in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA und nur gebundener Farbstoff fluoresziert nach Anregung. Das Amplikon sollte eine Länge von 150-250 bp besitzen. Bei diesem sensiblen System sind die Reaktionszeiten des Amplifizierungszyklus wesentlich kürzer als bei der herkömmlichen PCR (Denaturierung 95°C 10 sec, Annealing 58-60°C 10 sec, Verlängerung 72°C 10 sec). Zum Abschluss der Reaktion wurde eine Schmelzkurve erstellt, um die Eigenschaften des amplifizierten Produkts bestimmen zu können. Verwendet wurde das Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG-Kit von Invitrogen. Dieser Mix enthält die für die Amplifikation der DNA erforderliche Reagenzien *SYBR Green I fluorescent dye*, Taq-Polymerase, Mg^{2+} , Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und dNTPs (wobei dTTP durch dUTP ersetzt wurde) und liegt als 2fach Mix vor. In einen 10 µl PCR-Ansatz wurden zu 5 µl 2fach *SYBR Green Mix* je 1,8 µl Primer (10 pmol/µl) und 1 µl Template pipettiert.

3.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, das die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung nutzt. Dieses Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt.

3.3.1 Agarosegele

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten, die eine Länge über 100 bp aufweisen, eignen sich Agarosegele als Matrix (Southern, 1979). Der Trennbereich dieser Gele kann durch Einstellung der Agarosekonzentration (0,6 - 2% (w/v)) variiert werden.

Zur Herstellung analytischer Agarosegele wurde Agarose in 1xTAE-Puffer in einem Mikrowellenherd erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben und die Gel-Lösung in eine Flachbettapparatur gegossen (Johnson and Grossman, 1977). Nach Erkalten des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 1xTAE-Puffer befüllt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 1/6 VT Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zum Längenvergleich wurde 0,5 µg eines DNA-Längenstandards in einer weiteren Spur aufgetrennt. Die bei der Elektrophorese verwendete Spannung betrug 5-10 V/cm Elektrodenabstand. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht (266 nm) fotografiert. Die DNA-Banden waren unter UV-Licht sichtbar, da Ethidiumbromid die Eigenschaft besitzt, zwischen die DNA-Basen zu interkalieren und dann zu fluoreszieren.

| | | | | |
|-------------------|------------|----------|-----------------------|-------------|
| TAE-Puffer | 50x | | Gel-Ladepuffer | |
| Tris | | 242 g/l | Fikoll | 40% (w/v) |
| Eisessig pH 7,7 | | 57,1 ml | Bromphenolblau | 0,05% (w/v) |
| EDTA | | 18,6 g/l | Xylencyanol | 0,05% (w/v) |

| |
|--------------------------------|
| Ethidiumbromid-Lösung |
| 10 mg/ml in ddH ₂ O |

3.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um ein spezifisches DNA-Fragment aus einem DNA-Gemisch zu isolieren, wurden ebenfalls Agarosegele zur Auftrennung verwendet. Nach der Separierung wurde die zu isolierende DNA-Bande mit Hilfe eines Transilluminators bei 365 nm detektiert. Die Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte mit dem *Gel Band Purification* Kit (Amersham Biosciences). Zu 100 mg Gel wurden 100 µl *Capture Buffer* gegeben und 5 min bei 60°C inkubiert, um das Gel zum Schmelzen zu bringen. Anschließend wurde die Lösung auf eine Säule geladen, 1 min inkubiert und 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Daran schloss sich ein Waschschriff mit 500 µl *Wash Buffer* und erneuter Zentrifugation an (2 min, 13.000 rpm). Um die DNA-Lösung zu eluieren, wurden je nach DNA-Menge 10-50 µl ddH₂O auf die Säule pipettiert, 1 min inkubiert und 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

3.4 Hirt's Extraktion

Diese Methode der Zellfraktionierung, mit dem Ziel, extrachromosomale DNA zu isolieren, wurde erstmals von Hirt (1967) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Extraktion angewendet, um Episomen nach Transfektion in eukaryontische Zellen wieder zu isolieren und z.B. hinsichtlich der Intaktheit oder des Methylierungsstatus zu untersuchen.

Zellen einer Maxikulturschale (ca. 10^7 Zellen) wurden trypsiniert und 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1xPBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Daraufhin wurden 500 μ l NaCl (5 M) tropfenweise zum röhrenden Zelllysatz zugegeben und ÜN bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt diente zur Ausfällung der extrachromosomalen DNA. Nach 40minütiger Zentrifugation (8000 rpm, 4°C) wurde der Überstand einer Ethanol-Fällung unterzogen. Anschließend wurde das gelöste Pellet für 30 min bei 37°C mit RNase verdaut. Um alle Proteine vollständig zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, der nochmals eine Ethanol-Fällung folgte. Das DNA-Pellet wurde in 50 μ l ddH₂O gelöst und weiter verwendet. Um die Menge an intakten Plasmiden abzuschätzen, wurden einige μ l für eine Transformation in *XL1 blue* verwendet und über die wachsenden Kolonien unter Einbezug der Kompetenz der Bakterien Rückschlüsse gezogen.

| | |
|-------------------|-------|
| Lysepuffer | |
| EDTA | 10 mM |
| Tris/HCl pH 7,5 | 10 mM |
| SDS | 0,6% |

3.5 Arbeiten mit RNA

3.5.1 Lagerung

Die Lagerung von RNA erfolgte bei -20°C in RNase freiem Wasser.

3.5.2 Isolierung von RNA

Für die Isolierung der in den geernteten Zellen befindlichen gesamt-RNA wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Zellen, die als *Monolayer* in einer Kulturschale wuchsen, wurden zuerst trypsiniert und zentrifugiert (5 min, 1000 rpm, RT). Nach Waschen des Zellpellets mit 1xPBS, wurden die Zellen unter Verwendung eines milden Detergens (RLT-Puffer) mit β -Mercaptoethanol lysiert und durch das zusätzliche Passagieren durch eine Kanüle homogenisiert. Das Lysat wurde daraufhin mit 1 VT 70%-igem EtOH versetzt. Bei der anschließenden Zentrifugation adsorbierte die Silicongelmembran einer Trennsäule

die freigewordene RNA. Nach mehreren Waschvorgängen wurde die adsorbierte RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser ausgewaschen und in einem ebenfalls RNase-freien Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.5.3 RT-PCR

Reverse Transkriptasen sind Enzyme, die die Umschreibung der einzelsträngigen RNA in eine doppelsträngige Komplementär-DNA (cDNA) katalysieren. Die Reverse Transkriptase ermöglicht die Untersuchung der Expressionsstärke eines Gens anhand der mRNA-Menge (und somit auch der cDNA-Menge). Die hergestellte cDNA kann dann über PCR ausgewertet werden.

Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkriptase und Oligo-dT als Primer in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RT-PCR mit dem RNA-PCR-Kit der Firma GeneAmp durchgeführt:

| Komponenten | Volumen in µl |
|-------------------------|-------------------|
| 25 mM MgCl ₂ | 4 µl |
| 10x PCR Puffer II | 2 µl |
| DEPC-Wasser | 3 µl -RNA Volumen |
| DGTP | 2 µl |
| DATP | 2 µl |
| DCTP | 2 µl |
| DTTP | 2 µl |
| Rnase-Inhibitor | 1 µl |
| MuIV | 1 µl |
| Random-Primer | 1 µl |
| RNA | 1 µg |
| Endvolumen | 20 µl |

RT-PCR Programm:

10 min - RT, 15 min - 42 °C, 5 min - 99 °C, 5 min - 5 °C

Für die anschließende PCR wurde jeweils 1 µl eingesetzt.

3.5.4 Northern Blot

Die präparative Auftrennung der Gesamt-RNA aus den jeweils zu analysierenden Zellen erfolgte in einem 1,2%-igem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurden 1,8 g Agarose mit 127,5 ml ddH₂O und 15 ml 10xMOPS-Puffer aufgekocht.

Nach Abkühlen auf 60°C wurden 7,5 ml Formaldehyd (37%) und 15 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) hinzugefügt. Die noch warme Lösung wurde in einen bereits mit einem Kamm bestückten Gelschlitten gegossen.

Gesamt-RNA (10-30 µg) wurde mit 2 VT Probenpuffer versetzt, 5 min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden zu den Proben 2 VT Ladepuffer gegeben. Die so vorbereiteten RNA-Proben wurden auf dem Gel bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand und einer Laufzeit von ca. 5 h in 1xMOPS-Puffer aufgetrennt.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proben durch Kapillartransfer („*blotting*“) auf eine Nylonmembran übertragen. Von unten nach oben wurde folgender „Sandwich“ für den Northern Blot aufgebaut (alle Bestandteile wurden zuvor in Gelgröße zurecht geschnitten): zuunterst eine Schicht von 2-3 cm trockene Saugpapiertücher, darüber 5 Lagen 3 MM Whatman-Papier. Die darauf aufgebrachte Nylonmembran wurde zuerst in ddH₂O äquilibriert und dann mit Transferpuffer getränkt. Darüber wurde das Gel mit den aufgetrennten RNA-Proben luftblasenfrei ausgebreitet. Obenaufl folgten 3 weitere in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere.

Schließlich folgte eine Filterpapier-Brücke in Gelbreite, die ebenfalls mit Transferpuffer getränkt wurde und dessen Ende in einem Gefäß mit Transferpuffer endete, so dass es als Kapillarbrücke den Transferpuffer auf den „Sandwich“ leitete. Der Blot wurde mit einem Gewicht beschwert. Der RNA-Transfer fand ÜN statt. Danach wurde die Nylonmembran für 5 min in Natriumphosphat-Puffer gewaschen. Durch Trocknen der Membran für 10 min bei 80°C und beidseitiger UV-Bestrahlung (254 nm, 2 x 2 min) wurde die RNA mit der Nylonmembran quervernetzt. Mit einer Kamera wurden unter UV-Licht Aufnahmen der 18S- und 28S-Untereinheiten der ribosomalen-RNA angefertigt, um die gleichmäßige Beladung des Gels zu dokumentieren.

| MOPS | 10x |
|-------------|------------|
| MOPS | 41,8 g/l |
| EDTA | 3,72 g/l |
| NaAc | 6,5 g/l |

| Probenpuffer | |
|------------------------|----------|
| Formamid (deionisiert) | 1 ml |
| Formaldehyd (37%) | 0,375 ml |
| 1x MOPS | 0,1 ml |

| Ladepuffer | |
|-------------------|-------|
| EDTA | 10 mM |
| Glycerin | 50% |
| Bromphenolblau | 0,04% |
| Xylencyanol | 0,04% |

| SSC | 20x |
|-----------------------|------------|
| NaCl | 175,3 g/l |
| Na-Citrat | 88,2 g/l |
| pH auf 7,0 einstellen | |

| Transferpuffer |
|-----------------------|
| 10x SSC |

| Natriumphosphat-Puffer | |
|--------------------------------------|---------|
| pH 6,8 | |
| 1 M NaH ₂ PO ₄ | 53,7 ml |
| 1 M Na ₂ HPO ₄ | 46,3 ml |

Die Membran wurde bei 65°C in 20 ml Church-Lösung rotierend für 2 h vorhybridisiert, um durch Absättigung unspezifischer Bindungsstellen den Hintergrund zu minimieren. Die Sonde, die der Hybridisierung an die zu identifizierende RNA dienen soll, wurde durch PCR mit cDNA als *Template* gewonnen und hatte eine Größe von ca. 200 bp. Um die Sonde radioaktiv zu markieren, wurden 20 ng PCR-Produkt und je 10 pmol Primer, die an den Enden des Amplikons hybridisieren, in einem Volumen von 20 µl 5 min bei 100°C in einem Becherglas denaturiert. Das langsame Abkühlen des Ansatzes im wassergefüllten Becherglas gewährleistete das Annealing der Primer an die Sonde. Für die Markierungsreaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 2,5 µl dNTP-Mix (ohne dCTP, 25 mM)
- 5 µl 10x Puffer
- 5 µl α -dCTP (50 µCi)
- 15,5 µl ddH₂O
- 1 µl T4 DNA Polymerase

Die Reaktion fand für 30 min bei 37°C statt und wurde nochmal nach Zugabe von 1 mM nicht radioaktivem dCTP um 10 min verlängert. Um die Sonde nach beendeter Polymerase-Reaktion von überschüssigen radioaktiven Nukleotiden zu trennen, wurde eine Schleudersäule verwendet. Diese Säule besteht aus einem 50 µl PCR-Gefäß in einem 1,5 ml Schraubdeckel-Gefäß. In das PCR-Gefäß wurde mit einer Nadel ein Loch in den Boden und den Deckel gebohrt. Das Gefäß wurde dann mit 5 mm Glasperlen (in TE) beschichtet und mit Sephadex G50 (gequollen in TE) aufgefüllt. Der Sondenansatz wurde mit 50 µl TE verdünnt und auf die Säule gegeben. Um die Sonde von den freien dNTPs zu trennen, wurde die Säule für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Nach der Prähybridisierung der Membran folgte nun die rotierende Inkubation der Membran bei 65°C in 20 ml Church-Lösung mit der zuvor hitzedenaturierten (100°C, 2 min) Sonde und 250 µg sonifizierter Lachssperma-DNA für mind. 16 h. Der Hybridisierung folgten nun 3 Waschvorgänge mit verschiedenen Puffern, um den Hybridisierungspuffer und die im Überschuss vorhandene Sonde zu entfernen: 2x SSC/1% SDS 15 min bei 65°C, 0,1x SSC/1% SDS 15 min bei 65°C, 0,1x SSC/1% SDS 15 min bei RT. Anschließend wurde die Membran in Haushaltsfolie gewickelt und autoradiographisch ausgewertet.

| | |
|-----------------------|-------|
| Church-Lösung | |
| Natriumphosphatpuffer | 0,5 M |
| pH 7,2 | |
| SDS | 7% |
| EDTA | 10 mM |

3.6 Arbeiten mit Bakterien

3.6.1 Vermehrung und Lagerung

Die Vermehrung der beschriebenen Bakterienstämme erfolgte bei 37°C auf LB-Agarplatten oder als Schüttelkultur in LB-Medium, eventuell mit geeigneten Antibiotika angereichert. Auf Agarplatten können die Bakterien bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum hinweg wurde einer LB-Bakteriensuspension Glycerin bis zu einer 15%igen Endkonzentration zugegeben. Die Bakterien wurden als Glycerinstock bei -80°C gelagert (Ausubel, 1989).

| LB-Medium | | Agarplatten | |
|---------------------|--------|--------------------|--------|
| Bactotrypton | 10 g/l | Bactotrypton | 10 g/l |
| Hefe-Extrakt | 5 g/l | Hefe-Extrakt | 5 g/l |
| NaCl | 10 g/l | NaCl | 5 g/l |
| pH 7,5 autoklaviert | | | |

Der Agar für die Agarplatten wurde autoklaviert, auf ca. 50°C in einem Wasserbad abgekühlt, und nach Zugabe geeigneter Antibiotika in Petri-Schalen gegossen. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

| Glycerinstock | |
|----------------------|------|
| Bakteriensuspension | 80 % |
| Glycerin | 20% |

Bei der Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräparation) erfolgte die Vermehrung in TB-Medium, das ein dichteres Wachstum der Bakterien ermöglicht (siehe 3.1.2.2).

3.6.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Zellen sind *E.coli*-Zellen, die durch Calciumeinschlüsse besonders geeignet sind, fremde DNA aufnehmen zu können. Die Herstellung kompetenter Bakterien und deren Transformation mit Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) durchgeführt (Hanahan, 1983). Bei dieser Methode können Transformationseffizienzen von bis zu 10^6 Transformanten pro μg Plasmid-DNA erreicht werden. Für die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 200 ml LB-Medium mit 1 ml Bakterien einer ÜN-Flüssigkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6 geschüttelt. Nach Erreichen der vorgesehenen Bakteriendichte wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm und 4°C pelletiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Puffer, Gefäße und Glaspipetten wurden ebenfalls auf diese Temperatur vorgekühlt. Das Pellet wurde vorsichtig in 40 ml TB-Puffer resuspendiert und 10 min inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min

bei 3200 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 9,3 ml TB-Puffer und 0,7 ml DMSO resuspendiert und 10 min inkubiert. Die Proben wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

| TB-Puffer | |
|-------------------|--------|
| Pipes | 10 mM |
| CaCl ₂ | 15 mM |
| KCl | 250 mM |
| MnCl ₂ | 55 mM |

Pipes, CaCl₂ und KCl wurden in ddH₂O aufgelöst und auf einen pH von 6,7 eingestellt. Das gelöste MnCl₂ wurde zum Puffer dazugegeben, der Puffer anschließend sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

3.6.3 Transformation von Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen wird Transformation genannt. Die Kompetenz wird zuvor durch eine Behandlung mit Calcium- oder anderen zweiwertigen Ionen (siehe 3.6.2) generiert. Sie bewirkt auf eine noch unbekannte Art und Weise eine wesentlich leichtere Aufnahme der DNA (Mandel and Higa, 1970). 50-200 µl transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100-500 ng Plasmid-DNA und einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis folgte eine Hitzebehandlung für 90 sec bei 42°C. Danach wurde 2 VT LB-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min bei 2.500 rpm) wurde das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatte enthielt ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum. Nach 10-16 h Inkubation bei 37°C konnten Einzelkolonien isoliert werden.

3.7 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

Für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Glasgeräte und Zentrifugenröhrchen verwendet. Alle Arbeiten wurden in Sterilboxen durchgeführt.

3.7.1 Lagerung und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Ein Aliquot (5×10^6 - 1×10^7 Zellen) in flüssigem Stickstoff gelagerter Zellen wurde bei RT aufgetaut und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Um das DMSO, das aus dem

Einfriermedium stammt, auszuwaschen, wurden die Zellen mit 9 ml Medium verdünnt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in eine Maxi-Kulturschale mit vorgelegten 10 ml Medium ausgesät.

3.7.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden in Gewebekulturschalen und, wenn nicht anders deklariert, in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep-Lösung in 5%-iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Die Hühnerzelllinie HD11 wurde in Iscove`s DMEM mit 8% FCS, 2% Hühnerserum und 1% Pen/Strep-Lösung in 5%-iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden sie in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrate umgesetzt. Das Umsetzen adhärenter Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS-Puffers wurden die Zellen 2 - 5 min in Versen-Trypsin-Lösung inkubiert. Die proteolytische Reaktion des Trypsins bewirkte das Ablösen der Zellen von den Gewebekulturschalen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml frischen Mediums abgestoppt, die abgelösten Zellen vorsichtig resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 auf neue Kulturschalen ausgesät.

DMEM-Medium

| | |
|---------------|-----------|
| DMEM | 13,38 g/l |
| Na-Bicarbonat | 3,7 g/l |
| HEPES | 25 mM |
| Autoklaviert | |

Iscove`s DMEM-Medium

| | |
|---------------|-----------|
| Iscove`s DMEM | 17,66 g/l |
| Na-Bicarbonat | 3,024 g/l |
| autoklaviert | |

Pen/Strep-Lösung

| | |
|--------------|-----------------|
| Penicillin | 10.000 units/ml |
| Streptomycin | 10.000 units/ml |

PBS-Puffer

| | |
|---|--------|
| Na ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH7,4 | 10 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,7 mM |
| NaCl | 137 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| autoklaviert | |

| | | | |
|---|------------------|--------------------------------------|--------|
| Versen-Trypsin-Lösung A | | Versen-Trypsin-Lösung B | |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 6 mM | CaCl ₂ | 0,6 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1 mM | MgSO ₄ | 0,4 mM |
| NaCl | 137 mM | Zutaten in 1/5 des Endvolumens lösen | |
| KCl | 2,6 mM | Lösung A+B vereinen | |
| EDTA | 3 mM | auf Endvolumen auffüllen | |
| Trypsin | aus 0,125% (w/v) | steril filtrieren | |
| Rinderpankreas | | bei -20°C lagern | |
| Zutaten in 3/4 des Endvolumens lösen, | 0,125% (w/v) | | |
| pH 7,0 einstellen | | | |

3.7.3 Einfrieren eukaryontischer Zellen

Zum Einfrieren wurden die Gewebekulturzellen mit Versen-Trypsin-Lösung (s. o.) abgelöst und nach Zugabe von Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1.000 rpm, RT), in 1 ml frisches Medium aufgenommen und in ein Cryogefäß überführt. Dazu wurde jeweils 1 ml Einfriermedium pipettiert. Die Ampullen wurden in einem Einfrierbehälter bei -70°C über Nacht langsam abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

| | |
|-----------------------|-----|
| Einfriermedium | |
| DMEM-Medium | 45% |
| FCS | 40% |
| DMSO | 15% |

3.7.4 DNA-Transfer in Zellen

CaPO₄-Methode

In dieser Arbeit wurde vor allem die CaPO₄-Methode zur Transfektion von eukaryontischen Zellen verwendet. Die eingesetzte DNA formiert zusammen mit dem Calciumphosphat Kristalle, die sich an die Zellen anhaften und von diesen über einen noch unbekannten, endocytotischen Mechanismus aufgenommen werden. Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor ihrer Transfektion so ausgesät, dass sie bei Abschluss des Experimentes fast konfluent waren. Transiente Transfektionen für Reporterassays wurden jeweils im Duplett angefertigt, aus denen ein Mittelwert und die korrespondierende Standardabweichung erstellt wurde. Für Transfektionen wurden die sog. HEBS-Methode angewendet, die entweder mit 6-well Schalen (Luc-Assay) oder Maxischalen (ChIP) durchgeführt wurde.

Ein Ansatz, der pro well ($9,6 \text{ cm}^2$) für die Transfektion verwendet wurde, setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz: 5,4 μg DNA

mit ddH₂O auf 183,6 μl aufgefüllt

21,6 μl 10xHEBS → vortexen

10,8 μl 2M CaCl₂ → jede einzelne Probe sofort nach Zugabe

vortexen

Nach der Zugabe von 10,8 μl CaCl₂ wurde der Ansatz für genau 11 min bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Für Maxischalen wurden jeweils zwei 5fach-Ansätze der beschriebenen Mengen für 1 Schale verwendet. Der Ansatz für eine Maxischale konnte nicht in einem Ansatz pipettiert werden, da bei der HEBS-Methode zur Kristallbildung ein Volumen von 2 ml nicht überschritten werden darf. 8-16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1xPBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium überschichtet.

| 10xHEBS | |
|----------------------------------|--------|
| HEPES pH 7,2 | 200 mM |
| NaCl | 1,37 M |
| Glucose | 60 mM |
| KCl | 50 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 7 mM |

Liposomen

Liposomen eignen sich besonders gut, um fremde DNA in Zellen zu schleusen. Die DNA wird komplexiert und so durch Endocytose von der Zelle aufgenommen.

Das polykationische Transfektionsreagenz MetafecteneTM basiert auf der Liposomen-Technologie und wurde nach Herstellerangaben für die Transfektion von JEG3-Zellen verwendet. FuGENE 6 ist ebenfalls ein liposomen-basierendes Transfektionsreagenz und besonders für die Transfektion von großen Plasmiden geeignet. Es wurde daher wie vom Hersteller beschrieben für die Transfektion von Episomen eingesetzt.

jetPEITM

Polyethyleneimin (PEI) ist ein organisches Polymer, das eine hohe Dichte an Aminogruppen besitzt, die protoniert werden können. Herrscht im Milieu ein physiologischer pH, so bindet dieses Polykation sehr stark an DNA. Wie das genaue Einschleusen der PEI-DNA-Komplexe funktioniert, ist noch unbekannt. Das PEI-Verfahren ist bei vielen Zellen sehr effektiv, jedoch scheint die Membran durch diese Aufnahmemethode sehr durchlässig zu sein, so dass die Zellen sehr sensibel gegenüber Umweltfaktoren werden.

Für die Transfektion von MEF-Zellen, wurde das Jet-PEI-Kit von Qbiogene verwendet. Für ein well wurden 3 μg DNA in 100 μl 150 mM NaCl und 6 μl Jet-PEI ebenfalls in 100 μl 150

mM NaCl gegeben. Daraufhin wurden beide Lösungen miteinander vermischt, wobei zu beachten ist, dass PEI in die DNA-enhaltende Lösung gegeben wird. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben 15-30 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben.

3.7.5 Hormoninduktion in der transienten Transfektion

In DNA-Transferexperimenten mit Hormoninduktion war es notwendig, die Zellen mindestens einen Tag vor dem Transfer in hormonfreiem oder T3-freiem Medium zu halten. Hierfür wurde das dem Medium zugesetzte fötale Kälberserum von endogenem Gesamthormon oder T3 befreit. Für die Herstellung von Serum ohne Hormon wurden 500 ml FCS für 2 h mit 25 g Aktivkohle bei RT gerührt, anschließend 1 h bei 6000 rpm zentrifugiert und zweimal sterilfiltriert (Porengröße bei der ersten Filtration 0,8 µm, bei der zweiten Filtration 0,2 µm). Das so behandelte Serum wurde in Aliquots zu 50 ml bei -20°C eingefroren. Um das FCS vom T3 zu befreien, wurden Anionenaustauscher-Beads verwendet. Für 250 ml FCS wurden 10 µg Beads dreimal mit ddH₂O äquilibriert (5 min, 3000 rpm, 4°C), um dann mit dem FCS für 5 h bei RT rotierend inkubiert zu werden. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4°C) und das FCS im Überstand erneut mit 10 µg äquilibrierten Beads ÜN bei RT rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4°C) und der Überstand über einen Faltenfilter (Ø 240 mm) von restlichen Beads befreit. Das vom T3 depletierte FCS wurde daraufhin zweimal sterilfiltriert (Porengröße bei der ersten Filtration 0,8 µm, bei der zweiten Filtration 0,2 µm) und in Aliquots bei -20°C eingefroren.

Die Hormonzugabe zum Medium erfolgte nach dem eigentlichen DNA-Transfer. In den durchgeführten Experimenten wurde jeweils eine Endkonzentration von 10⁻⁶ M T3/9-cis Retinsäure/all-trans Retinsäure/Hydroxycholeinsäure verwendet. Nach 48 h erfolgte eine erneute Zugabe, da die Hormone im Medium nach dieser Zeit abgebaut wurden.

3.7.6 Ernte und Aufschluss der Zellen

24-72 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei RT mit 250 µl Lysepuffer inkubiert. Nach 15 min wurden die Schalen aufgestellt und der Zellextrakt in Reaktionsgefäße überführt. Bis zur Messung wurde der Extrakt auf Eis aufbewahrt.

| | |
|-------------------|-------|
| Lysepuffer | |
| Tris/HCl pH 7,5 | 25 mM |
| MgCl ₂ | 8 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Triton X100 | 1% |
| Glycerin | 15% |
| pH 7,1-7,5 | 15% |
| frisch : DTT | 1 mM |

3.7.7 Aktivitätsbestimmung der Luciferase (Luc-Assay)

Die Messung der Genaktivität beim Einsatz der Luciferase (Luc) als Reportergen erfolgte über die Quantifizierung des gebildeten Enzyms Luciferase. Dazu wurde der Proteinextrakt aus den transfizierten Zellen mit einem Überschuss des Substrates Luciferin und ATP inkubiert und die Stärke der Umsatzreaktion anhand der Lichtemission bestimmt. Zur Messung der Proben wurden jeweils 100 µl Proteinextrakt 4 sec nach Einstellen in das Gerät automatisch mit 100 µl Luciferin-ATP-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 5 sec wurde die Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sec gemessen und als Summe gezählt (Integration).

| | |
|-----------------------------|---------|
| Luciferin-ATP-Lösung | |
| D-Luciferin | 90 mg/l |
| ATP | 0,8 mM |
| pH 7 | |

3.7.8 Aktivitätsbestimmung der β-Galactosidase

Das Reporterplasmid pCMV-lacZ, welches ein β-Galactosidase-Gen enthält, wurde in transienten Transfektionen zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eingesetzt. Die Aktivität des Enzyms wird photometrisch anhand eines gelben Farbumschlags detektiert. o-Nitrophenol wird von o-Nitro-phenol-β-Galactopyranosid (ONPG) abgespalten und kann quantitativ im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 420 nm erfasst werden kann. Es wurden 100 µl Proteinextrakt mit 750 µl Z-Puffer und 200 µl ONPG versetzt und bis zum Farbumschlag bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Die Enzymaktivität ergibt sich aus der Farbveränderung pro Zeit, d.h. nach ausreichender Farbveränderung wurden alle Proben gleichzeitig direkt im Photometer gemessen. Die Enzymaktivität wurde anhand folgender Formel errechnet:

$$OD_{420 \text{ nm}} \times 1000 = \text{LacZ-Wert}$$

Eine Normalisierung erfolgte indem die Luciferase-Einheiten anschließend zu den entsprechenden LacZ-Werten ins Verhältnis gesetzt wurden (Luc/LacZ).

| | | | |
|--|--------|-------------------------|-------|
| Z-Puffer | | ONPG-Lösung | |
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 60 mM | KPO ₄ pH=7,0 | 0,1 M |
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 40 mM | ONPG | 4 g/l |
| KCl | 10 mM | | |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,1 mM | | |
| pH 7, sterilfiltrieren | | | |

3.7.9 FACS (*fluorescent activated cell sorting*)-Analyse

Zur Quantifizierung der GFP-Expression wurde die Durchflußcytometrie genutzt (FACS-Analyse).

48 h nach Transfektion wurden die Zellen für die Auswertung im Cytometer geerntet. Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und trypsinisiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit FCS wurden die Zellen für 10 min bei 2000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen und in 450 µl 1xPBS im FACS-Röhrchen auf Eis und im Dunkeln bis zur Messung aufbewahrt. Pro Ansatz wurden 100.000 Zellen („Events“) bei folgender Einstellung gemessen.

Detectors/Amps:

| Param. | Detector | Voltage | AmpGain | Mode |
|--------|----------|---------|---------|------|
| P1 | FSC | E-1 | 5.00 | Lin |
| P2 | SSC | 313 | 1.00 | Lin |
| P3 | FL1 | 481 | 1.00 | Log |
| P4 | FL2 | 394 | 1.00 | Log |
| P5 | FL3 | 650 | 1.00 | Lin |

3.8 Arbeiten mit Proteinen

3.8.1 Lagerung von Proteinen

Alle Arbeiten mit Proteinen wurden bei 4°C oder auf Eis ausgeführt. Es wurden nur sterile Geräte und Lösungen benutzt. Für die Lagerung bei -80°C wurde den Proteinen 1/10 VT Glycerin zugesetzt.

3.8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgt spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Sie basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer

sauren Coomassie-Lösung von 495 nm zu 595 nm, wenn Protein zur Lösung hinzugefügt wird.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1-10 µl Proteinlösung mit 200 µl Roti®-Quant versetzt und durch Zugabe von 0,25 M Tris/HCl pH 7,8 auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Die Proben wurden gegen einen proteinfreien Leerwert bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration errechnet sich aufgrund einer Eichkurve gemäß der Formel:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{595 \text{ nm}} \times 19,89 / \text{eingesetztes Volumen}$$

3.8.3 Herstellung von Ganzzellextrakt

Methode A

Diese Methode zur Herstellung von Ganzzellextrakt wurde für eine anschließende immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot verwendet. Die Zellen wurden hierfür nach Waschen mit 1xPBS-Puffer auf der Zellkulturschale mit einem Gummischaber in 1xSDS-Auftragspuffer geerntet. Um die enthaltene genomische DNA zu zerstören, wurde der Extrakt für 2x10 sec bei Level 1 sonifiziert. Vor Auftragen von gleichen Volumina für den Western Blot wurden die Proben gekocht und zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min).

| SDS-Auftragspuffer | 5x |
|---------------------------|--------------|
| Tris/HCl pH 6,8 | 62,5 mM |
| Glycerin | 20% (v/v) |
| SDS | 2% (w/v) |
| β-Mercaptoethanol | 5% (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,125% (w/v) |

Methode B

Diese Methode diente zur Herstellung von Gesamtzellextrakt mit anschließender Protein-Konzentrationsmessung. Alle Angaben beziehen sich auf ein 6well. Das Medium wurde von den Zellen abgezogen, die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und daraufhin mit 100 µl Lyse-Puffer 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellspatel abgeschabt, resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen zu ernten, wurden die Proben für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen Proteinen enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt. Dann wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.8.2).

| Lysepuffer | |
|-----------------------|-------------------|
| Tris/HCl pH 7,2 | 20 mM |
| NaCl | 200 mM |
| NP40 | 0,5% |
| Proteaseinhibitor-Mix | 1 Tablette/ 50 ml |
| Lagerung bei 4°C | |

3.8.4 Herstellung von Kernextrakt

Proteine können aus Zellen mittels nuklearer Extraktion gewonnen werden. Folgendes Protokoll wurde für eine Maxischale angewandt: Die Zellen wurden zunächst abtrypsiniert und mit 1xPBS gewaschen (5 min, 1000 rpm, RT). Daraufhin wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 ml 1/10 PBS gewaschen (5 min, 1000 rpm, 4°C). Um die Zellen zu lysieren, wurde das Pellet in 1 ml 1/10 PBS mit 0,5% NP40 für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend gevortext und zentrifugiert (5 min, 3000 rpm, 4°C). Nach Waschen des Kernpellets mit 50%-igem PBS erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt (5 min, 3000 rpm, 4°C). Die Kerne wurden daraufhin nochmal mit 50%-igem PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Lysepuffer (siehe 3.8.3) 20 min rotierend inkubiert. Danach wurden die lysierten Kerne erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4°C). Die Kernproteine befanden sich im Überstand.

3.8.5 Denaturierende Polyacrylamidgele

Um ein einzelnes Protein in einem Gemisch nachzuweisen, bedarf es einer Auftrennung der Proteine und ihrer anschließenden Visualisierung entweder durch direkte Anfärbung (z.B. Coomassie) oder mittels einer spezifischen Nachweisreaktion (Immunoblot).

In dem von Ulrich Lämmli 1970 erstmals beschriebenen System lassen sich Proteinmischungen unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe auftrennen (Laemmli, 1970). Bei diesem Verfahren dient das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Entfalten der Proteinstrukturen. Dabei lagern sich pro AS durchschnittlich zwei Moleküle SDS an und geben allen Proteinen eine elipsoide Raumstruktur, was eine ausschließlich durch das Molekulargewicht abhängige Auftrennung ermöglicht. Eine stark reduzierende Chemikalie (β -Mercaptoethanol) bricht zusätzlich alle Disulfid-Bindungen auf. Auf diese Weise standardisierte Proteinmischungen können über die regulierbare Matrix eines Polyacrylamidgels der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei nutzt man die doppelt negative Ladung von SDS aus, die alle Eigenladungseffekte der Proteine überdeckt und eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und erfolgt in Richtung Anode.

Das verwendete Gelsystem steht senkrecht und besteht aus zwei Polyacrylamid-Bereichen, die sich im pH-Wert unterscheiden und nacheinander von den Proteinen durchlaufen werden. Dabei fokussiert das obenliegende Sammelgel die Proteinprobe in einem schmalen Band, bevor mit dem Wechsel zum Trenngel der pH-Anstieg eine Auftrennung bewirkt. Dabei kann die Porengröße des Trenngels mit unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration variiert werden, so dass eine optimale Auftrennung in jeweils verschiedenen Molekulargewichts-Bereichen gewährleistet ist. Zur Bestimmung der Molekulargewichte

wurde parallel ein standardisiertes Proteingemisch (Marker) aufgetragen. Alle Zubehörteile des Gelsystem Hoefer Mighty Small wurden mit entionisiertem Wasser und 70% (v/v) Ethanol gereinigt. Es wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8 (w/v)) benutzt, die 10 bis 15%-ig im Trenngel, und 6%-ig im Sammelgel eingesetzt wurde. Die gewünschten Gellösungen wurden für Trenn- und Sammelgel separat angesetzt.

| Sammelgel | 6% | Trenngel | 10% | 15% |
|---------------------|-----------|----------------------|------------|------------|
| 0,5M Tris/HCl pH6,8 | 2,5 ml | 1,5M Tris/HCl pH 8,8 | 3,8 ml | 3,8 ml |
| PAA/BAA (30:0,8) | 2 ml | PAA/BAA (30:0,8) | 5 ml | 7,5 ml |
| ddH ₂ O | 5,5 ml | ddH ₂ O | 6,2 ml | 3,7 ml |
| SDS 10% | 100 µl | SDS 10% | 150 µl | 150 µl |
| APS | 50 µl | APS | 50 µl | 50 µl |
| TEMED | 10 µl | TEMED | 5 µl | 5 µl |

Zur Polymerisierung wurden zunächst das Trenngel und später das Sammelgel in die vorbereiteten Gießstände gefüllt. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurden sie in eine entsprechende Apparatur eingespannt und mit 1 X Lämmli-Puffer gefüllt.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Auftragspuffer (5x konz.) versetzt und 5 min gekocht. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA pro Gel (Einlaufen der Proben in die Matrix) begonnen und dann bei 25-30 mA weitergeführt.

Eine Visualisierung von Proteinbanden wurde durch Färbung der Gele in Coomassie-Lösung (60 min) ermöglicht. Die Nachweisgrenze dieser Methode lag im Bereich von 0,4 µg Protein pro Bande. Die Entfärbung (mehrere Stunden) des Hintergrundes durch Entfärbelösung erfolgte genauso wie die Färbung auf einem Schüttler bei RT. Nach vollständiger Entfärbung der Gele konnten diese auf einem Leuchttisch ausgewertet und durch Fotografie dokumentiert werden.

| Entfärbelösung | | Coomassie-Färbelösung | |
|-----------------------|-----------|------------------------------|------------|
| Methanol | 40% (v/v) | Coomassie blue R250 | 0,2% (w/v) |
| Eisessig | 10% (v/v) | in Fixierer | |

| Lämmli-Puffer | 10x |
|----------------------|------------|
| Tris | 250 mM |
| Glycin | 1920 mM |
| SDS | 1% |

3.8.6 Elektrophoretik

Der Elektrophoretik erlaubt den Transfer von zuvor in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Da diese Proteine mit SDS beladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode und können so aus der Gelmatrix heraus auf eine Membran transferiert werden.

In dieser Arbeit wurde die so genannte „*semi-dry*“ Methode angewendet, bei der der Transfer in Anwesenheit von befeuchtetem Material erfolgt. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran und Filterpapiere (Whatman-3MM-Chromatographiepapiere) wurden vor dem Blotten exakt auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit den verschiedenen Transfer-Puffer getränkt.

Der Aufbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema:

- befeuchtete Anode
- 6 Lagen Filter in Anode I-Puffer getränkt
- 3 Lagen mit Anode II-Puffer befeuchtet
- PVDF-Membran einige sec in 100% Methanol aktiviert und mit ddH₂O getränkt
- Gel
- 6 Lagen Filterpapier in Kathode-Puffer getränkt
- befeuchtete Kathode.

Der Blot wurde mit 0,8-1 mA/cm² Blottfläche für 2 h durchgeführt.

| | | |
|-----------------------|-----------|-------|
| Anode I-Puffer | 2x | |
| Tris | | 0,6 M |

| | | |
|------------------------|-----------|--------|
| Anode II-Puffer | 2x | |
| Tris | | 0,05 M |

| | | |
|-----------------------|-----------|--------|
| Kathode-Puffer | 2x | |
| 6-Aminocaproid-Säure | | 80 mM |
| Tris | | 0,05 M |

3.8.7 Immunodetektion

Die Immunodetektion ist eine sensitive Nachweismethode für Proteine. Diese Methode beruht auf der immunologischen Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) mit seinem Antigen (Protein). Zur Visualisierung dieses Antikörper/Antigen-Komplexes dient ein gegen den Primärantikörper gerichteter, enzymgekoppelter Sekundärantikörper. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper wird eine Signalverstärkung erreicht, die zusammen mit der hohen Sensitivität der Enzymreaktion die Empfindlichkeit dieses Nachweissystems ausmacht.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Primärantikörper aus Kaninchen in Kombination mit geeigneten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern eingesetzt. Nach dem Elektrophoretik wurde die „proteinbeladene“ PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen ÜN bei 4°C mit einer fettfreien Milchlösung (5%

(w/v) Milchpulver in PBST) inkubiert. Die abgesättigte Membran wurde daraufhin für 2 h mit dem in PBST verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten (3 x 5 min mit PBST), zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Primärantikörpern, wurde die Membran für eine weitere Stunde mit einem entsprechend in PBST verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen (s.o) und stand danach für die Nachweisreaktion mit dem ECL-Kit zur Verfügung. Hierzu wurde die Membran auf einem Stück Haushaltsfolie mit einem Gemisch aus gleichen Anteilen der ECL-Detektionslösung A und B benetzt und für eine Minute inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran in Folie verpackt, in einer Filmkassette befestigt und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Signalentstehung bei diesem Entwicklersystem beruht auf einer verstärkten Peroxidase-katalysierten Chemilumineszenz. In den meisten Fällen reichten Expositionen zwischen 5 sec und 5 min aus, um ausreichende Signalintensitäten zu erreichen.

| | |
|---|--------|
| PBST | |
| Na ₃ PO ₄ 2H ₂ O pH7,4 | 10 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,7 mM |
| NaCl | 137 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Tween 20 | 0,1% |

3.8.8 In vitro Transkription/Translation

Für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translationsreaktion wurde eine Komplettausrüstung der Firma Promega verwendet, wobei die Durchführung gemäß den Herstellerangaben erfolgte. Die Arbeiten wurden ausschließlich mit Handschuhen, RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen sowie mit nukleasefreiem Wasser durchgeführt. Der Puffer und alle anderen Komponenten wurden auf Eis aufgetaut. Im Folgenden ist die Zusammensetzung eines 1x Ansatzes aufgelistet, welcher bei Bedarf vervielfacht wurde. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 90 min bei 30°C inkubiert.

| Komponenten | Volumen in µl |
|---------------------------------------|---------------|
| TNT-Reticulocyten-Lysat | 6,25 µl |
| TNT Reaktionspuffer | 0,5 µl |
| Aminosäure-Mix (ohne Methionin) | 0,25 µl |
| ³⁵ S-Methionin (15 µCi/µl) | 1 µl |
| DNA (1 µg/µl) | 0,25 µl |
| TNT Polymerase (T7, T3, SP6) | 0,25 µl |
| Rnasin | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | 3,5 µl |
| Endvolumen | 12,5 µl |

Sollte der Einfluss von Hormon auf die Interaktion zwischen einem *in vitro* translatierten Rezeptor und einem GST-Fusionsprotein untersucht werden, wurde der Translationsansatz mit einer entsprechenden Menge Hormon für 20 min bei RT vor dem Pulldown inkubiert (siehe auch 3.10.1).

3.8.9 Expression rekombinanter Proteine

In dieser Arbeit wurde die Expression eukaryontischer Gene als GST-Fusion in *E. coli* durchgeführt. Nach der Transformation eines entsprechenden Plasmids wurde ein Einzelklon für 12 h bei 37°C in 5 ml TB mit 25 µl Glucose (20%) und geeignetem Antibiotikum vermehrt. Die Kultur wurde in 400 ml antibiotikumhaltigem TB-Medium mit 40 ml Phosphatpuffer und 20 ml Glucose (20%) überführt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bis 0,8 bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration im Medium) die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins. Der Ansatz wurde für weitere 5 h bei RT oder 12 h bei 18°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 3200 rpm, 4°C) und in 30 ml STE-Puffer gut resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet nochmal in 30 ml STE-Puffer resuspendiert. Die Bakterienlyse wurde durch Aktivierung des endogenen Lysozyms mittels Einfrieren des Pellets ÜN bei -20°C verstärkt. Danach wurden die Proben bei RT aufgetaut und die Proteine durch Zugabe von 300 µl 1 M MgCl₂, 15 µl 2 M MnCl₂, 300 µl DNase I (1mg/ml), 300 µl RNase A (1 mg/ml) und 300 µl Lysozym (50 mg/ml) rotierend für 30-45 min freigesetzt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (30 min, 11.000 rpm, 4°C) entfernt und der Überstand bei -80°C in Aliquots aufbewahrt.

| STE-Puffer | |
|-------------------|--------|
| NaCl | 150 mM |
| Tris/HCl pH 8 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

3.8.10 Affinitätsaufreinigung GST-fusionierter Proteine

Diese Methode zur Aufreinigung der rekombinanten GST-Fusionsproteine beruht auf der spezifischen Enzym/Substrat-Wechselwirkung von GST mit Glutathion. Durch Immobilisierung des Glutathions an einer Matrix aus Sepharose lassen sich GST-Fusionsproteine durch Zentrifugation von den restlichen Bestandteilen des Proteinextraktes trennen.

Bevor die Glutathion-Sepharose für Bindereaktionen eingesetzt wurde, fand ein Waschschrift mit 1xPBS statt, um u.a. das aus der Lagerung stammende Ethanol zu entfernen. Der

aufzureinigende Extrakt wurde mit einer entsprechenden Menge der äquilibrierten Matrix für 2 h bei 4°C inkubiert. Bei Proteinextrakten, die aus einer 400 ml Bakterienkultur stammten, wurden z.B. 300 µl der Sepharose eingesetzt. Anschließend wurde die Sepharose mittels Zentrifugationsschritten (5 min, 1000 rpm, 4°C) dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

| Waschpuffer | |
|--------------------|--------|
| Tris/HCl pH 8 | 100 mM |
| NaCl | 100 mM |

Je nach weiterem Verwendungszweck wurde nun unterschiedlich verfahren.

Thrombinspaltung

Mit Hilfe der GST-Fusion lässt sich eine stringente Aufreinigung von Proteinen erzielen. Stört jedoch diese Fusion für weitere Untersuchungen, kann der GST-Anteil durch Thrombinspaltung entfernt werden. Die meisten Vektoren (z.B. pGEX-2T), die zur Expression von GST-Fusionen eingesetzt werden, beinhalten eine Thrombinschnittstelle zwischen der GST-Sequenz und dem zu exprimierenden Protein. Um eine Abspaltung mittels Thrombin durchzuführen, wurde wie folgt verfahren.

Die an die GST-Sepharose gebundenen Proteine wurden anfänglich zweimal mit 1 ml Spaltungspuffer gewaschen. Die Spaltung des GST-Abschnitts erfolgte dann in 300 µl Spaltungspuffer mit 10 µl Thrombin (0,25 u/µl) bei 4°C rotierend für 2 h. Der Überstand nach der sich anschließenden Zentrifugation beinhaltet die abgespaltenen Proteine. Die so gewonnen Proteinlösungen wurden mit 20% Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

| Spaltungspuffer | |
|------------------------|-------|
| Tris/HCl pH7,5 | 50mM |
| NaCl | 150mM |
| CaCl ₂ | 2,5mM |

3.8.11 Acetylierung von rekombinanten Proteinen

In dieser Arbeit wurde eine *in vitro* Modifizierung von GST-Fusionsproteinen durch Acetylgruppen durchgeführt. Dabei übertragen Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) die Acetylgruppe von dem Donor Acetyl-CoA auf einen möglichen Empfänger. Die Enzyme p300 und pCAF wurden als HATs verwendet, wobei die N-terminalen Bereiche verschiedener Histonarme als Empfänger der Acetylgruppe dienten.

Die rekombinanten Acetyltransferasen GST-p300 und GST-pCAF wurden aus bakteriellem Proteinextrakt gewonnen, mit GST-Sepharose aufgereinigt und anschließend mit Hilfe von Thrombin vom GST gespalten. Um die Aktivität dieser Extrakte zu ermitteln, wurden 1-2 µg

eines HAT-Extrakts mit ca. 2-3 µg zuvor gereinigter GST-Histon-Arme für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion erfolgte in 1xAcetylierungspuffer mit 1 µCi ³H-markiertem Acetyl-CoA. Anschließend wurden die Proben mit 1xSDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min gekocht. Danach wurden die Ansätze mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von autoradiographischen Methoden visualisiert.

| Acetylierungspuffer | 5x |
|----------------------------|-----------|
| Tris/HCl pH 8 | 0,3 M |
| Glycerin | 19 % |
| DTT | 5,8 mM |
| Na-Butyrat | 58 mM |

3.9 Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen

3.9.1 Chromatin-Immunopräzipitation

Mit dieser Methode können in Zellsystemen *in vivo*-Bindungen von Proteinen an genomischer Kern-DNA nachgewiesen werden. Alle Puffer müssen frei von DNA sein und es wurden ausschließlich Filtertips verwendet, um DNA-Kontaminationen zu verhindern.

Für die ChIP-Analyse transient transfizierter Episomen wurden Zellen mit Episomen transfiziert und nach 24 h in max. 3 Maxischalen gesplittet.

Jeweils eine Maxischale, ca. 10⁷ Zellen, wurde entsprechend des Experiments behandelt, z.B. für eine bestimmte Zeit mit Hormon inkubiert. Danach erfolgte zuerst der DNA/Protein-Crosslink in den Zellen. Dafür wurde 37%-iges Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% direkt zum Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei RT inkubiert. Dabei erfolgte die kovalente Bindung der interagierenden Proteine an die DNA. Die Kreuzvernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 1/7 Volumen 1M Glycin und weiterer Inkubation von 5 min bei RT beendet. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 1 ml kaltes 1xPBS, das mit 1 mM PMSF versehen wurden, geerntet. Daraufhin wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, in 1 ml SDS Lysepuffer (+ Proteinaseinhibitoren, 1 mM PMSF) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Sonifizierung (7-10x 10 sec, Level 1, konstanter Puls) im 15 ml Falcon auf Eis bewirkte die vollständige Zelllyse und die mechanische Fragmentierung des kreuzvernetzten Chromatins. Dabei entstanden Chromatinfragmente einer mittleren Größe von ca. 500 bp. Anschließend erfolgte die Abtrennung von Zellbruchstücken durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 rpm und 4°C. Der Überstand konnte nach diesem Schritt mit 5% Glycerin versetzt und bei -80°C bis zur Immunopräzipitation gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden je 200 µl Aliquot mit 1800 µl Dilutionspuffer + 1mM PMSF aufgefüllt. 20 µl des Überstandes wurden für den Input bei –20°C aufbewahrt. Vor der eigentlichen Präzipitation wurde der Zellextrakt vorgereinigt. Hierfür wurden je 30 µl Protein A-Agarose Beads (50% *slurry*) einmal mit Dilutionspuffer äquiliert und anschließend mit dem verdünnten Zellextrakt (2 ml) und 5 µl Präimmunserum bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben bei 2000 rpm (5 min, 4°C), wurde der Überstand mit 5 µg des entsprechenden Antikörpers über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit 5 µl Präimmunserum inkubiert. Die Bindung der gebildeten Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von je 30 µl Protein A-Agarose, die mit Dilutionspuffer äquiliert wurde, und anschließender Inkubation für 2 h bei 4°C. Die Präzipitate wurden mit jeweils 1 ml Niedrigsalzpuffer, Hochsalzpuffer, LiCl-Puffer und zweimal mit je 1 ml TE gewaschen. Das Waschen bestand aus einer 5minütigen Inkubation (rotierend) bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm. Die DNA/Protein-Komplexe wurden daraufhin durch zweimalige Inkubation mit je 250 µl Elutionspuffer (rotierend) für 15 min bei RT eluiert. Der Input wurde ebenfalls mit Elutionspuffer auf 500 µl aufgefüllt. Durch die Zugabe von 20 µl 5 M NaCl und anschließender Inkubation bei 65°C ÜN erfolgte die Auflösung der durch Formaldehyd vermittelten DNA/Protein-Bindung.

Die freigesetzten Proteine und enthaltene RNA wurden zuerst mit 5 µg RNase A für 2 h bei 37°C und anschließend mit 20 µg Proteinase K bei 45°C zerstört. Um das für den Verdau notwendige Milieu zu schaffen, wurden dem Präzipitat zuvor 10 µl 0.5 M EDTA und 100 µl 0.5 M Tris-HCl pH 6,8 zugesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung unter Verwendung von 10 µg Glykogen als *Carrier*. Die Fällung erfolgte bei –20°C ÜN. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 43 µl ddH₂O und 7 µl TE aufgenommen. Für PCR oder Realtime-PCR wurden je 1 µl als Template verwendet.

SDS Lysepuffer

| | |
|-----------------------|--------|
| SDS | 1% |
| EDTA | 10 mM |
| Tris/HCl pH 8,1 | 50 mM |
| Proteaseinhibitor-Mix | 1:1000 |

Dilutionspuffer

| | |
|-----------------|---------|
| SDS | 0,01% |
| Triton X100 | 1,1% |
| EDTA | 1,2 mM |
| Tris/HCl pH 8,1 | 16,7 mM |
| NaCl | 167 mM |

Niedrigsalzpuffer

| | |
|-----------------|--------|
| SDS | 0,1% |
| Triton X100 | 1% |
| EDTA | 2 mM |
| Tris/HCl pH 8,1 | 20 mM |
| NaCl | 150 mM |

Hochsalzpuffer

| | |
|-----------------|--------|
| SDS | 0,1% |
| Triton X100 | 1% |
| EDTA | 2 mM |
| Tris/HCl pH 8,1 | 20 mM |
| NaCl | 500 mM |

| | | | |
|--------------------|--------|------------------|-------|
| LiCl-Puffer | | TE-Puffer | |
| LiCl | 0,25 M | Tris | 10 mM |
| NP40 | 1% | EDTA | 1 mM |
| Deoxycholat | 1% | pH 8 | |
| EDTA | 1 mM | | |
| Tris/HCl pH 8,1 | 10 mM | | |

3.9.2 Gelretardierungsexperiment (EMSA)

Bei dieser Art von Experimenten kann die Bindung von Proteinen an kurze, radioaktiv markierte DNA-Fragmente durch eine verringerte Mobilität der entstehenden DNA-Protein-Komplexe gegenüber der ungebundenen DNA nachgewiesen werden. Nach der Autoradiographie zeigen sich dabei neben der nicht von Protein besetzten DNA-Bande („Freie Probe“), welche die höchste Mobilität besitzt, eine oder mehrere Banden geringerer Mobilität, welche durch die Bildung verschiedener DNA-Protein-Komplexe hervorgerufen werden.

Herstellung einer radioaktiven Sonde

1 µg eines Doppelstrang-Oligos wird in einem Volumen von 50 µl mit 5 µl 10x PNK Puffer, 1 µl PNK und 5 µl entsprechen 50 µCi γ ATP versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die freien Nukleotide wurden dann mittels einer Schleuderseule (siehe 3.5.4) abgetrennt.

EMSA-Reaktion

5-10 µg *E.coli*-exprimiertes GST-Fusionsprotein wurde zunächst in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1x Bandshift-Puffer mit Kompetitor-DNA versetzt, um unspezifische Interaktionen mit der DNA zu verhindern. Nach 20 min RT wurde dann 1 µl der markierten Probe zum Ansatz hinzugegeben und wiederum für 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf ein 5%-iges PAA-Gel geladen und bei einer maximalen Stärke von 5 W für 3-4 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 10% MeOH/5% CH₃COOH fixiert und für 1,5 h im Gelrockner getrocknet.

| | |
|-------------------------|-----------|
| Bandshift-Puffer | 2x |
| Hepes pH 7,4 | 40 mM |
| Glycerin | 20 % |
| KCl | 40 mM |
| MgCl | 2 mM |
| DTT | 10 |
| ZnCl ₂ | 20 µM |
| BSA | 200 µg/ml |
| NP40 | 0,04% |

3.10 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

3.10.1 GST-Pulldown

Dieses Verfahren eignet sich zur *in vitro* Analyse von Interaktionen zwischen Proteinen und beruht auf einer Immobilisierung von Glutathion-S-Transferase-(GST-)-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose (Kaelin et al., 1991). Immobilisierte GST-Fusionsproteine wurden in einem zweiten Schritt mit *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem Protein inkubiert. Im Falle einer Bindung beider Proteine miteinander wurde das ³⁵S-markierte Protein ebenfalls immobilisiert und konnte nach Copräzipitation anschließend autoradiographisch nachgewiesen werden.

Die GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Jeweils 30 µl äquilibrierte Beads wurden zweimal mit Waschpuffer, der mit 1,5 mg/ml BSA angesetzt wurde, um unspezifische Bindungen zu verhindern, gewaschen (5 min, 2000 rpm, 4°C). Nach der letzten Zentrifugation folgte die Bindereaktion. Dafür wurden 5 µl eines *in vitro* Transkriptions/Translationsansatzes (siehe 3.8.8) pro Reaktion zusammen mit 170 µl Waschpuffer (1,5 mg/ml BSA) dazugegeben. Nach einer zweistündigen rotierenden Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze dreimal für 15 min mit Waschpuffer (ohne BSA) gewaschen, bevor sie mit 1xSDS-Auftragspuffer versetzt wurden. Als Input wurden 5% des Überstandes der Kontrollbindereaktion mit GST vor den Waschschritten genommen. Gebundene GST-Fusionsproteine wurden anschließend durch Coomassie-Färbung, ³⁵S-markierte Proteine mittels Autoradiographie visualisiert.

3.10.2 Acetylierungsabhängige Interaktionsanalyse mittels GST-Pulldown

Um Proteininteraktionen nach der Acetylierung eines Substrates durch Acetyltransferasen zu analysieren, wurde eine modifizierte Variante des GST-Pulldowns durchgeführt. Die N-terminalen Bereiche der Histone, die in dieser Arbeit als Acetylierungssubstrat verwendet wurden, wurden wie unter 3.8.11 beschrieben als bakteriell exprimierte GST-Konstrukte zuerst in einer Acetylierungsreaktion mit nicht-radioaktiv markiertem Acetyl-CoA eingesetzt. Um zu untersuchen, ob eine Interaktion durch Acetylierung verändert wird, wurde ein paralleler Ansatz ohne die Zugabe von Acetyl-CoA als Vergleich mitgeführt. Anschließend wurden die so behandelten GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose immobilisiert und weiter entsprechend des GST-Pulldown-Protokolls verfahren. Ein Vergleich der entsprechenden autoradiographischen Signale zwischen mit und ohne Acetyl-CoA behandelten Substraten ermöglichte die Analyse eines Einflusses der Acetylierung auf die Interaktion.

3.10.3 Histonbindungs-Assay

Mit Hilfe dieser Methode kann untersucht werden, ob bestimmte Proteine an Histone binden. Bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine wurden wie unter 3.8.9 beschrieben exprimiert und an äquilibrierte GST-Sepharose für 2 h bei 4°C gebunden. Es folgten drei Waschschrte mit dem Nucleosom-Bindepuffer (1 ml, 1000 rpm für 3 min bei 4°C), bevor die immobilisierten Proteine mit 200 µg BSA in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert wurden. Diese Blockreaktion fand bei RT für 30 min rotierend statt. Nach drei weiteren Waschschrten wurde der gesamte Überstand abgenommen und 10 µg Histon-Mix (H2A/H2B/H3/H4) zusammen mit 100 µg BSA in einem Volumen von 200 µl zugegeben. Der einstündigen Bindereaktion bei RT folgten sechs Waschschrte. Anschließend wurden die Proben mit 1xSDS-Auftragspuffer versetzt und neben 40% Input auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die anschließende Coomassie-Färbung machte sowohl die GST-Fusionsproteine als auch die Histone sichtbar.

| Nucleosom-Bindepuffer | |
|-------------------------------|----------|
| Tris/HCl pH 7,5 | 20 mM |
| KCl | 270 mM |
| MgCl ₂ | 5 mM |
| NP40 | 1% |
| DTT | 1 mM |
| BSA | 10 µg/ml |
| Proteaseinhibitor-Mix (Roche) | 1:1000 |

3.10.4 Histonmethyltransferase (HMT)-Assay

Um zu untersuchen, ob ein Protein generell mit einer Histonmethyltransferase interagiert, wurde ein HMT-Assay durchgeführt. Die zu analysierenden Proteine wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Jeweils 30 µl äquilibrierte Beads wurden fünfmal mit RIPA-Puffer gewaschen (5 min, 2000 rpm, 4°C) und anschließend für 3 h in 200 µl RIPA-Puffer und 50 µl kommerziell erworbenem HeLa Kernextrakt bei 4°C rotierend inkubiert. Während dieser Zeit kann die mögliche Interaktion mit einer HMT stattfinden. Um zu testen, ob das zu analysierende Protein selbst eine HMT-Funktion aufweist, wurde die Inkubation auch ohne Kernextrakt durchgeführt. Die Glutathion-Beads wurden hierauf pelletiert (5 min, 2000 rpm, 4°C) und viermal mit RIPA-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Pellets mit Jenuwein-Puffer äquilibriert. Die gewaschenen GST-Beads wurden nun mit ³H-SAM als Methyl donor und Histonen als Substrat in Jenuwein-Puffer 4 h bei 30°C rotierend inkubiert. Eine Copräzipitierung von Histonmethyltransferasen aus dem Kernextrakt wurde über eine Methylierung und somit radioaktive Markierung der Histone nachgewiesen. Die

Zugabe von 1xSDS-Auftragspuffer und 5minütiges Kochen der Proben stoppte die Methylierungsreaktion. Mit einer SDS-Gelelektrophorese (15%) wurden die Proteine voneinander separiert, durch Coomassie fixiert und angefärbt. Das Gel wurde mit einer Fixierlösung entfärbt, 30 min in einer Verstärker-Lösung inkubiert und nachfolgend auf Whatman 3 MM Papier bei 80°C für 90 min getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden unter Verwendung einer Verstärkerfolie fluorographisch detektiert.

HMT-Reaktionsansatz:

- gewaschene Beads mit gebundenen GST-Fusionsproteinen

- 2 μl ^3H -SAM

- 1 μl Histone (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

- 1x Jenuwein-Puffer

- mit ddH_2O auf 30 μl Endvolumen aufgefüllt

| RIPA-Puffer | |
|--------------------|--------|
| Tris/HCl pH 8 | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Natriumdeoxycholat | 0,5% |
| SDS | 1% |
| NP40 | 1% |

| Jenuwein-Puffer | | 5x |
|--------------------------|--|--------|
| Tris/HCl pH 8,5 | | 50 mM |
| KCl | | 20 mM |
| MgCl ₂ | | 10 mM |
| β -Mercaptoethanol | | 10 mM |
| Sucrose | | 250 mM |

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung des murinen APP-Promotors

4.1.1 Der murine APP-Promotor besitzt eine potentielle kombinierte CTCF/TR-Bindestelle

Literaturrecherchen nach bisher unbekannten kombinierten CTCF/TR-Bindestellen führten zur näheren Betrachtung des Gens, das für das Amyloide Vorläuferprotein β (APP β) kodiert. Es wurde bereits beschrieben, dass CTCF im APP β -Promotor in einem Bereich bindet, der sich zwischen der Position -42 und -53 bp des Transkriptionsstarts des humanen APP β -Gens befindet und zu einer Transkriptionsaktivierung führt (Vostrov and Quitschke, 1997; Yang et al., 1999). Weitere Literaturrecherchen zeigten, dass sich stromabwärts des Transkriptionsstarts des humanen APP β (im 1. Exon) ein negatives *Thyroid hormone response element* (TRE) befindet. Es wurde gezeigt, dass ein TR/RXR-Heterodimer an dieses Motiv bindet und in der Abwesenheit von Hormon die APP β -Expression erhöht, während T3 die Promotoraktivität auf Basalniveau senkt (Belandia et al., 1998). Die in zwei unabhängigen Publikationen beschriebenen Bindestellen für CTCF und TR im humanen APP β -Promotor wurden bisher nicht hinsichtlich eines gemeinsamen Einflusses auf die Transkriptionsaktivität untersucht. Der Abstand von 147 bp zwischen den beiden Bindestellen ist vergleichbar mit den bereits veröffentlichten kombinierten CTCF/TR-Bindestellen, die sich zwischen 10 bis 133 bp voneinander entfernt befinden (Lutz et al., 2003). Sequenzvergleiche mit dem murinen Genom identifizierten eine zu 100% homologe Sequenz im Bereich der humanen CTCF-Bindestelle (70 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes), jedoch keinerlei Übereinstimmung im Bereich des humanen nTRE. Bei der Suche nach möglichen TREs im murinen APP β -Promotors wurde ein potentielles TRE stromaufwärts der CTCF-Bindestelle identifiziert (Abb. 4.1).

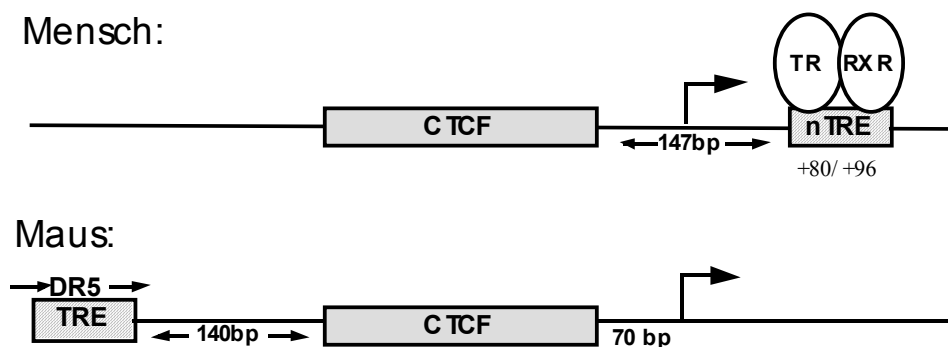


Abb. 4.1: Der murine APPβ-Promotor besitzt eine potentielle kombinierte CTCF/TR-Bindestelle. Schematische Darstellung der publizierten CTS (Vostrov and Quitschke, 1997) und nTREs (3 Halbseiten, (Belandia et al., 1998) im humanen APPβ-Promotor. Im murinen Genom ist die CTS konserviert, jedoch nicht die TR-Bindestellen. Sequenzanalysen identifizierten ein potentielles TRE (DR5) 140 bp stromaufwärts der CTS.

Das putative TRE im murinen APPβ Promotor besteht ebenfalls wie das humane TRE aus zwei Halbseiten, es wird jedoch statt von 4 (human) von 5 Nukleotiden voneinander getrennt. Die putativen CTCF- und TR-Bindestellen im murinen APPβ-Promotor liegen mit 140 bp Distanz ähnlich weit voneinander entfernt wie im humanen APPβ-Promotor.

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| humanes APPβ-TRE (DR4) | 5'GGGCAG AGCA AGGACG 3' |
| murines APPβ-TRE (mögliches DR5) | 5' GGGTCA GGGAG AGGACC 3' |

4.1.2 Murine N2aβ-Zellen als Modell für die APP-Regulation

Die Expression des APPβ, welches eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung spielt, wird von einer Vielzahl von zellulären Faktoren in einer zellabhängigen Art und Weise beeinflusst. Obwohl APPβ in geringer Expression anscheinend in neurotrophe Ereignisse involviert ist, verursacht seine Überexpression vermutlich neuronale Degenerierung durch einen Mechanismus, der auf einer Neurotoxizität durch erhöhte Produktion von β-Amyloid-Protein beruht (Fukuchi et al., 1992; Mattson et al., 1993; Yoshikawa et al., 1992). Um den Einfluss von CTCF und TR auf die APPβ-Expression zu untersuchen, wurde eine murine Neuroblastoma-Zelllinie ausgewählt, in der die APPβ-Expression endogen durch T3 beeinflusst wird. Die parentale Zelllinie N2a, die einen kaum messbaren Level an endogenem TRβ besitzt, wurde hierfür stabil mit dem humanen TRβ transfiziert (Lebel et al., 1994). Diese N2aβ-Zellen dienen im Weiteren als Modell, um zu

untersuchen, ob sich im APP β -Promotor eine kombinierte CTCF/TR-Bindestelle befindet und ob sich deren Einfluss auf die APP β -Expression bemerkbar macht.

Um zu überprüfen, ob N2a β -Zellen funktionellen TR β enthalten, wurde zunächst von diesen Zellen Cytoplasma- und Kernextrakte gewonnen und in einem Western Blot mit einem Antikörper gegen TR dessen Expression getestet. Dieses Experiment zeigte, dass TR im Kernextrakt detektiert werden kann (Abb. 4.2A). Die Funktionalität des stabil integrierten TR β wurde anhand einer transienten Transfektion überprüft. N2a β -Zellen wurden mit einem Reporterkonstrukt, das ein Luciferasegen unter Kontrolle eines Thymidinkinase-Promotors mit zwei vorgeschalteten TREs beinhaltete, transfiziert und für 48 h mit oder ohne T3 behandelt. Die starke Aktivierung des Luciferasegens in der Anwesenheit von Hormon kann auf einen funktionell aktiven TR β zurückgeführt werden (Abb. 4.2B). Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die nicht nur mit dem Luciferasereporter sondern auch mit TR β transfiziert wurden. Die erhöhte Transaktivierung des Reportergens im Falle der N2a-Zellen ist auf eine TR β -Überexpression zurückzuführen. Diese beiden Experimente zeigten, dass N2a β -Zellen funktionell aktiven TR β enthalten.

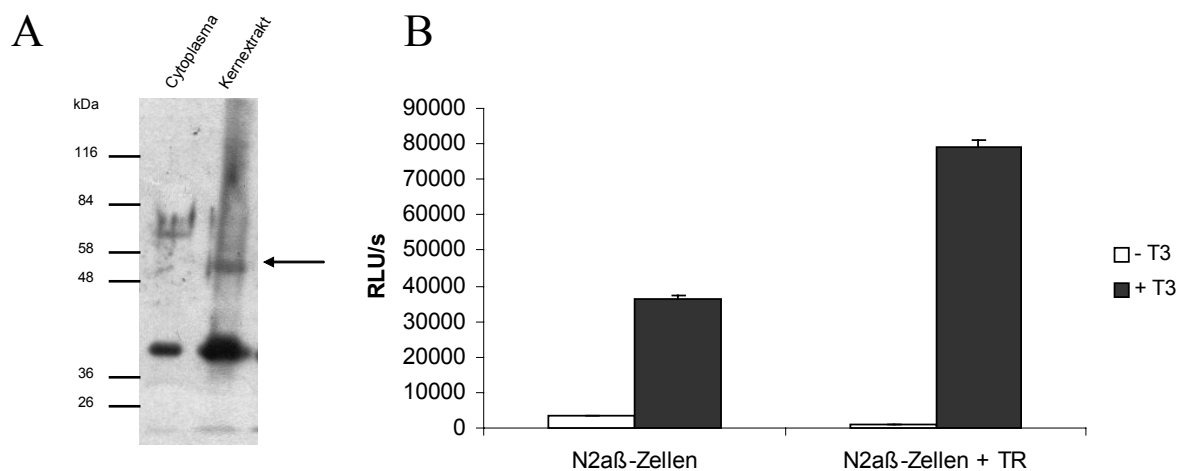


Abb. 4.2: Murine N2a β -Zellen enthalten funktionell aktiven TR β .

(A) Cytoplasma- und Kernextrakt wurde aus N2a β -Zellen gewonnen. Je 5 μ g Proteinextrakt wurde für die Western Blot-Analyse verwendet und mit einem anti TR-Antikörper inkubiert. Die Laufhöhe von TR im Kernextrakt ist mit einem Pfeil markiert. (B) N2a β -Zellen wurden in 6wells mit 1 μ g (DR4)₂tk-luc Reporterplasmid und mit oder ohne 0,2 μ g TR-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden in Hormon-freiem Medium oder in der Anwesenheit von 10^{-6} M T3 kultiviert und nach 48 h geerntet. Die Luciferaseaktivität wurde im Luminometer nachgewiesen.

Interessant für weitere Untersuchungen einer möglichen kombinierten CTCF/TR-Bindestelle und deren Einfluss auf die APP β -Expression war, dass bereits ein Zusammenhang zwischen dem Thyroid-Status und der Alzheimer-Erkrankung nahe gelegt wurde. Thyroidhormon ist für eine normale Gehirnentwicklung und -funktion essentiell. Hormondefizite verursachen Kretinismus und neurologische Symptome, die denen der Alzheimer-Erkrankung ähneln

(Dussault and Ruel, 1987). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass T3 das Spleißen und die Sekretion der APP-Isoformen in Neuroblastoma-Zellen beeinflusst (Latasa et al., 1998). N2a β -Zellen eignen sich als Modell für die APP β -Expression, da die Behandlung dieser Zellen mit T3 Differenzierungsvorgänge in Gang setzen und zu einer Entwicklung von Nervenvorläuferzellen, sog. Astrozyten, führt. N2a β -Zellen wurden für diese Untersuchung für 7 Tage mit 10^{-6} M T3 oder all-trans-Retinsäure, welche ein Ligand für den RAR ist, behandelt. Im Vergleich zu Zellen, die in Hormon-depletiertem Medium gehalten wurden, veränderte sich die Morphologie der N2a β -Zellen nach T3-Zugabe drastisch. Die Zellen stoppten ihr Wachstum und bildeten Astrozyten aus (Abb. 4.3A). Die Kalkulation der Zellzahl ergab eine 7fache Reduktion der Zellproliferation durch T3 (Abb. 4.3B). Die Behandlung mit all-trans-Retinsäure hatte auf das Zellwachstum keinen Einfluss, was zur Vermutung führt, dass die Expression des endogenen RARs bei der Entwicklung in diesen Nervenvorläuferzellen offensichtlich keine Rolle spielt.

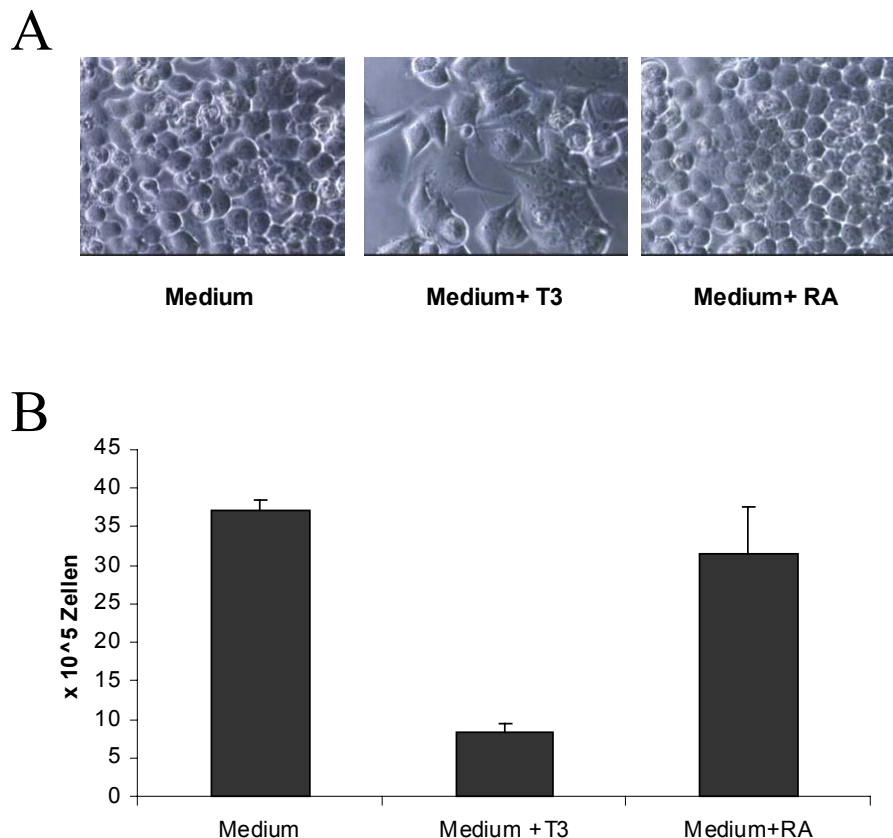


Abb. 4.3: Inhibierung der Zellproliferation durch T3-Behandlung in N2a β -Zellen.

N2a β -Zellen wurden in 6wells ausgesät und für 7 Tage ohne Hormon oder in der Anwesenheit von 10^{-6} M T3 oder all-trans-Retinsäure kultiviert. Anschließend wurde die Zellmorphologie fotografisch dokumentiert (A) und die Zellzahl bestimmt (B).

Um den Einfluss von T3 auf die APP β -Expression in murinen N2a β -Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen für verschieden Zeiträume mit 10^{-6} M T3 behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und die APP β -mRNA-Menge mit Hilfe eines Northern Blots

nachgewiesen. Konform mit bereits veröffentlichten Daten wurde mit zunehmender Dauer der T3-Behandlung eine verminderte Expression der APP β -mRNA detektiert (Belandia et al., 1998). Bereits nach 24 h war die APP β -Expression unter das Detektionslevel gesunken (Abb. 4.4). Als Kontrolle wurde im Northern Blot auch eine Sonde gegen β -Aktin-mRNA eingesetzt, die keinen Effekt auf die APP β -mRNA-Expression zeigte. Als Ladekontrolle der RNA-Proben diente der Vergleich der 28S-Untereinheit der Gesamt-RNA. Dieses Experiment führte zu der Annahme, dass sich auch im murinen APP β -Promotor ein funktionelles, negatives TRE befindet.

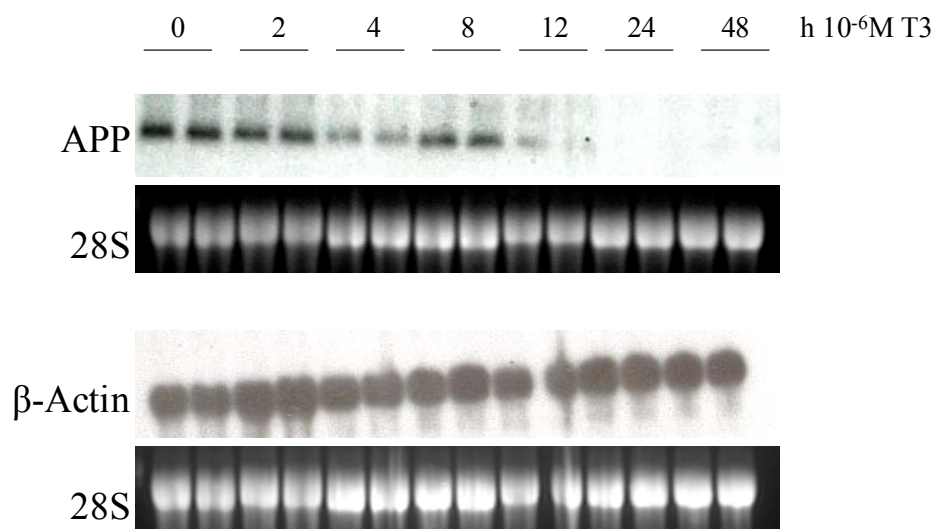


Abb. 4.4: Das murine APP β -Gen wird in N2a β -Zellen negativ reguliert.

Gesamt-RNA wurde aus N2a β -Zellen isoliert, die zuvor in 10 cm-Schalen ausgesät und für die angegebenen Zeiträume mit 10^{-6} M T3 behandelt wurden. Je 40 μ g RNA/Spur wurde im Northern Blot eingesetzt und die APP β - und β -Aktin-Gene anschließend mit spezifischen Sonden detektiert. Zur Ladekontrolle wurde vor dem Northern Blot die 28S-Untereinheiten der RNA-Proben fotografisch dokumentiert.

4.1.3 CTCF und TR binden im APP β -Promoter

Sequenzvergleiche des humanen und des murinen APP β -Promotors führten zur Annahme, dass der murine Promotor eine mögliche kombinierte CTCF/TR-Bindestelle besitzt (siehe 4.1.1). Um eine Bindung von CTCF und TR an dieses Element *in vitro* zu untersuchen, wurden Gel-Retardierungsexperimente durchgeführt. Unter Verwendung der putativen murinen APP β -CTS konnte gezeigt werden, dass sowohl GST-CTCF ZF als auch GST-CTCF an diese Sequenz bindet. Die verlangsamte Wanderung des DNA-Fragments durch die CTCF-Bindung kann sowohl durch einen Überschuss an nicht-radioaktiv markierter APP β -CTS-Bindestelle als auch durch eine bereits publizierte CTS (F1) kompetiert werden

(Abb. 4.5). Gel-Retardierungsexperimente mit in *E.coli* exprimiertem TR zeigten eine Bindung dieses Rezeptors an das mögliche TRE des murinen APP β -Promotors. Um die Spezifität der Bindung zu kontrollieren, wurden Konkurrenzexperimente mit einer nicht-radioaktiv markierten Sonde des APP β -TRE durchgeführt, die zeigten, dass die durch die Bindung von TR β hervorgerufene Retardierung kompetiert wurde (Abb. 4.5).

Diese Experimente zeigen, dass sich im murinen APP β -Promotor sowohl eine mögliche Bindestelle für CTCF als auch für den TR befindet.

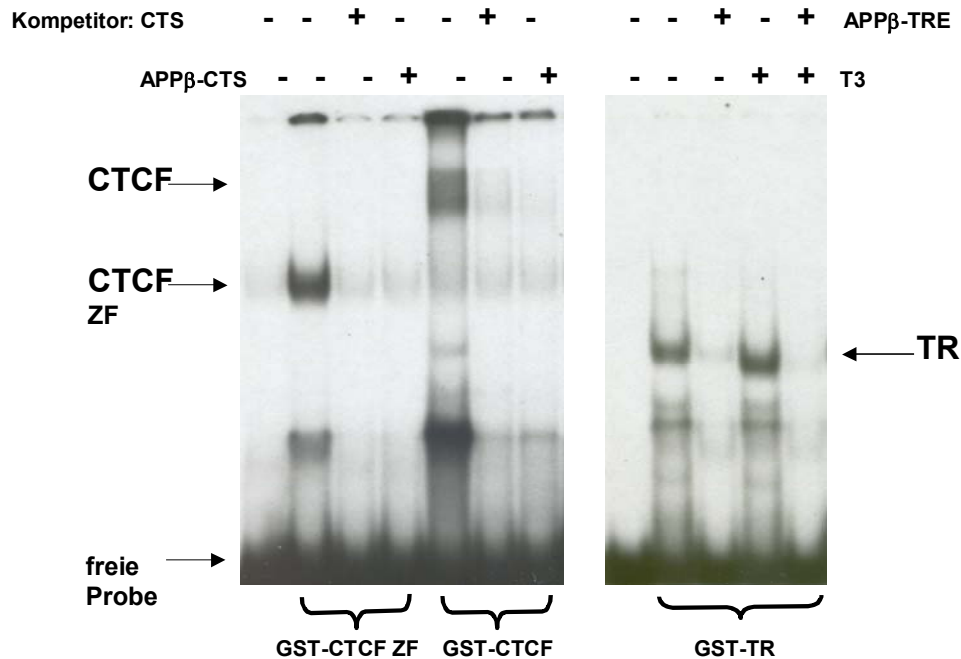


Abb. 4.5: Der APP β -Promotor wird von CTCF und TR *in vitro* gebunden.

0,5-2 µg *E.coli*-exprimiertes und aufgereinigtes GST oder GST-Fusionsprotein (pGEX-4T1avi-CTCF/CTCF ZF/TR) wurden zusammen mit 10 ng radioaktiv markiertem Oligonukleotid (APP CTS oder TRE) inkubiert und anschließend auf einem 5%-igen PAA-Gel aufgetragen. Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze zusätzlich mit 200fachem Überschuss an nicht-radioaktiv markierter DNA-Probe (F1 CTS, APP CTS oder APP TRE) versetzt. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von GST-CTCF, GST-CTCF ZF und GST-TR.

Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Leers zur Verfügung gestellt.

Um die spezifische Bindung von CTCF an die APP β -CTS zu bestätigen, wurden durch Mutagenese drei Nukleotide innerhalb der CTS verändert (Abb. 4.6A). Dieses DNA-Fragment wurde ebenfalls im Gel-Retardierungsexperiment auf CTCF-Bindung untersucht. Eine durch GST-CTCF-Bindung an radioaktiv markiertes F1 hervorgerufene Retardierung kann durch den Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem F1 oder APP β -CTS, aber nicht durch die mutierte APP β -CTS kompetiert werden. In gleicher Weise kann die durch die Bindung von GST-CTCF verlangsamte Wanderung der APP β -CTS nicht durch die mutierte APP β -CTS kompetiert werden (Abb. 4.6B). Dies legt nahe, dass CTCF nicht an die APP β -

CTS binden kann, in der drei Nukleotide im Vergleich zur natürlichen CTS ausgetauscht wurden.

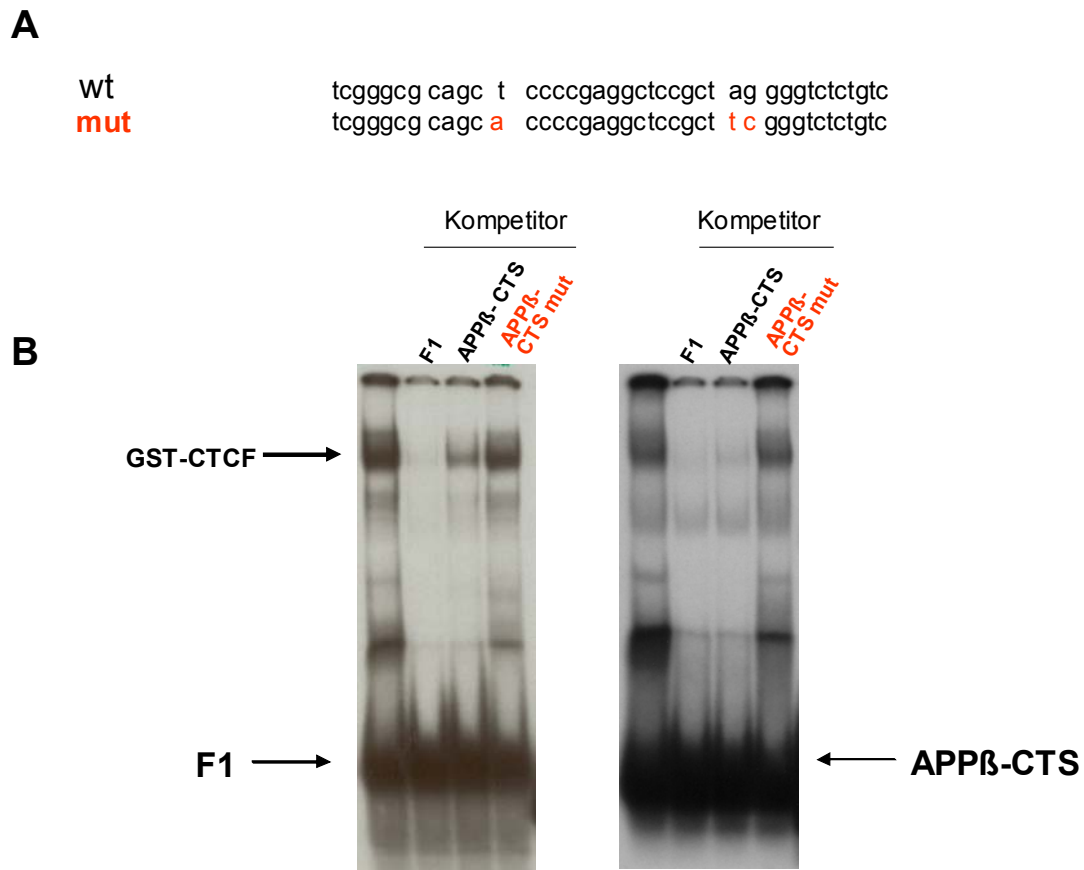


Abb. 4.6: Die Mutation der APP-CTS verhindert eine *in vitro*-Bindung von CTCF.

A: Darstellung der wt und mutierten Sequenz der APP β -CTS.

B: 0,5-2 μ g *E.coli*-exprimiertes und aufgereinigtes GST oder GST-CTCF wurden zusammen mit 10 ng radioaktiv markiertem Oligonukleotid (F1 oder APP-CTS) inkubiert und anschließend auf einem 5%-igen PAA-Gel aufgetragen. Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze zusätzlich mit 200fachem Überschuss an nicht-radioaktiv markierter DNA-Probe (F1, APP-CTS oder APP-CTS mut) versetzt. Die Pfeile markieren die freie Probe und die Laufhöhe von GST-CTCF.

Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Leers zur Verfügung gestellt.

Um darüber hinaus einen *in vivo*-Beweis für die Bindung von CTCF im APP β -Promotor zu erhalten, wurden ChIP-Analysen mit Chromatin von N2a β -Zellen durchgeführt. Die Präzipitation mit einem CTCF-Antikörper und anschließender Amplifizierung des genomischen Bereichs der murinen APP β -CTS zeigte eine deutliche Rekrutierung von CTCF. Als Negativkontrolle wurde zum einen Chromatin mit Präimmunserum inkubiert und amplifiziert. Hierbei wurde kein Produkt gebildet. Zum anderen wurden, um die spezifische Bindung von CTCF im APP β -Promotor zu zeigen, Primer verwendet, die einen Genombereich 0,5 kb stromaufwärts der möglichen APP β -CTS amplifizieren (APP-Kontrolle). Hier war ein deutlich schwächeres Signal für CTCF sichtbar (Abb. 4.7). Dieses

Restsignal ist vermutlich auf die DNA-Größe nach dem Sonifizieren zurückzuführen, die in der Regel zwischen 0,5 bis 1 kb betrug.

Für diese und die nachfolgenden ChIP-Experimente wurde zusätzlich eine weitere kombinierte CTCF/TR-Bindestelle analysiert. Für das murine c-myc Gen wurde gezeigt, dass CTCF an die sog. Bindestelle A bindet, die sich im ersten Exon befindet und mit der Pausierungsstelle der RNA-Polymerase II überlappt (Klenova et al., 1993). Andere Studien identifizierten nTREs benachbart zur CTS, die für die Repression des c-myc Gens von Bedeutung sind (Perez-Juste et al., 2000). Das mögliche Zusammenspiel von CTCF und TR auf diesem Element wurde jedoch noch nicht näher untersucht. Unter Verwendung von Primern, die spezifisch die Bindestelle A des c-myc Gens amplifizierten, konnte ebenfalls eine *in vivo*-Bindung von CTCF gezeigt werden (Abb. 4.7).

Zusammenfassend wurde die Bindung von CTCF und TR β im murinen APP *in vitro* gezeigt und die CTCF-Rekrutierung wurde ebenfalls *in vivo* bestätigt. Darüber hinaus konnte die *in vivo*-Bindung von CTCF an eine weitere, bisher uncharakterisierte, kombinierte Bindestelle (c-myc) demonstriert werden. Mangels eines funktionellen TR-Antikörpers für die ChIP-Analyse wurde dessen Bindung im Folgenden anhand weiterer Methoden analysiert.

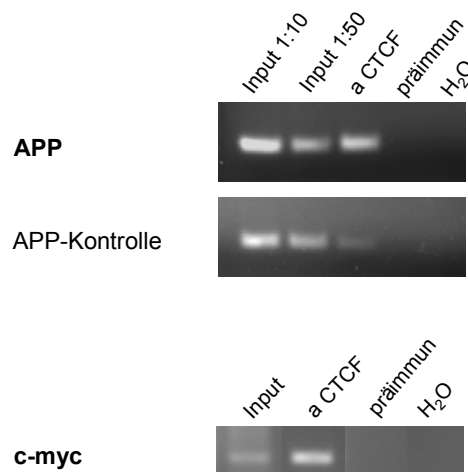


Abb. 4.7: CTCF wird an die APP und c-myc Gene *in vivo* rekrutiert.

Für die ChIP-Analyse wurde Chromatin von N2a β -Zellen, die in hormonhaltigem Medium kultiviert wurden, verwendet. Der Zellextrakt wurde für die Präzipitation mit 5 μ l anti-CTCF Antikörper oder Präimmunserum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für die APP-CTS (APP), 0,5 kb stromabwärts der APP-CTS (APP Kontrolle) oder c-myc Bindestelle A (c-myc). Für die PCR-Reaktion wurde je 1 μ l des verdünnten Inputs (1:10, 1:50), der aufgereinigten Präzipitate (α CTCF, Präimmunserum) und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Template (H₂O) verwendet.

4.1.4 T3-Behandlung führt zu einer Veränderung der Cofaktor-Rekrutierung und Chromatinmodifizierung im Bereich der CTCF/TR-Bindestellen

Es wurde bereits berichtet, dass die Bindung des TR an ein nTRE zu einer Induktion der Transkriptionsaktivität führt, wohingegen die Anwesenheit von Ligand diese Aktivität umkehrt und Repression unterhalb des Basallevels hervorruft (Hollenberg et al., 1995; Naar et al., 1991; Wondisford et al., 1993). Es ist jedoch noch nicht genau bekannt, welcher Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Cofaktoren NcoR und SMRT, die auf pTREs in der Abwesenheit von T3 als Corepressoren fungieren, in der Abwesenheit von Hormon auf nTREs zu Coaktivatoren werden (Tagami et al., 1997).

Um zu untersuchen, ob die T3-Behandlung von N2a β -Zellen nicht nur zu einer verminderten Expression der APP β - und c-myc-mRNA, sondern auch zu einer Veränderung in der Histonmodifizierung und Cofaktor-Rekrutierung führt, wurden ChIP-Analysen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt.

Um darüber hinaus einen weiteren Hinweis für die TR-Bindung an die potentiellen kombinierten Bindestellen zu erhalten, wurde untersucht, ob der Corepressor Alien im Bereich der APP β - und c-myc-CTS rekrutiert wird. Es ist bekannt, dass Alien in einer hormonsensitiven Weise mit TR interagiert und HDAC-Aktivität rekrutiert (Dressel et al., 1999). Anhand der Amplifizierung der APP β - und c-myc-CTS konnte gezeigt werden, dass Alien an beide Elemente rekrutiert wird, was zur Vermutung führt, dass TR an diese Elemente bindet (Abb. 4.8). Jedoch konnte Alien nur in der Anwesenheit von T3 auf diesen Elementen präzipitiert werden, welches dem Zustand der Transkriptionsrepression entspricht. Dies würde bedeuten, dass der Cofaktor Alien, im Gegensatz zu SMRT und NcoR, sowohl auf einem pTRE als auch auf einem nTRE als Corepressor fungiert.

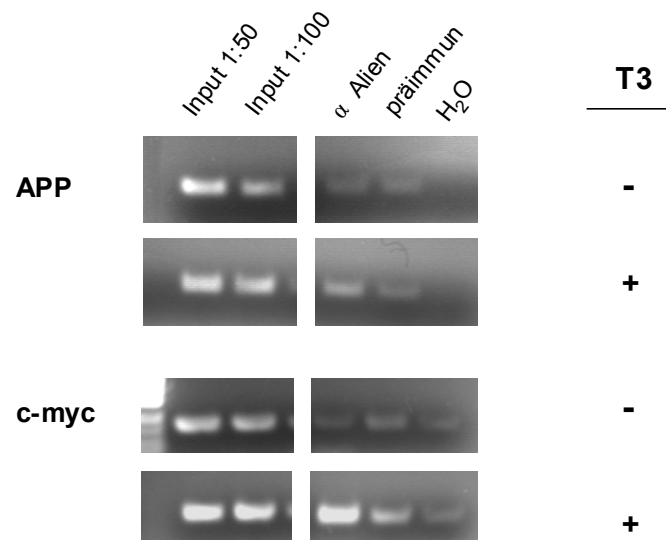


Abb. 4.8: Der Corepressor Alien wird an die APP- und c-myc-Gene nur in der Anwesenheit von T3 rekrutiert.

Für die ChIP-Analyse wurde Chromatin von N2aβ-Zellen, die in hormonfreiem Medium oder für 1 h in der Anwesenheit von 10^{-6} M T3 kultiviert wurden, verwendet. Der Zellextrakt wurde für die Präzipitation mit 5 µg anti Alien-Antikörper oder 5 µl Präimmunserum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für die APP-CTS (APP) oder c-myc-Bindestelle A (c-myc). Für die PCR-Reaktion wurde je 1 µl des verdünnten Inputs (1:50, 1:100), der aufgereinigten Präzipitate (α Alien, Präimmunserum) und als Negativkontrolle ein Ansatz mit Wasser (H₂O) verwendet.

Unter Verwendung eines Antikörpers gegen acetyliertes Histon H4 in der ChIP-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der N2aβ-Zellen mit T3 zu einem starken Anstieg der Acetylierung führt, sowohl im Bereich der CTS des APPβ-Promotors als auch der c-myc-Bindestelle A (Abb. 4.9). Ein Anstieg der Histon H4-Acetylierung korreliert im Allgemeinen mit Transkriptionsaktivität. Da jedoch die T3-Behandlung zu einer Reprimierung der Genexpression führt, kann dieser Anstieg der Acetylierung nur mit dem Befund erklärt werden, dass Cofaktoren und Histonmodifizierungen auf Promotoren von hormonregulierten Genen in Wellen rekrutiert werden, wie es im Detail für den Östrogenrezeptor studiert wurde, ein Effekt, der als Transkriptionsuhr bezeichnet wird (Metivier et al., 2003).

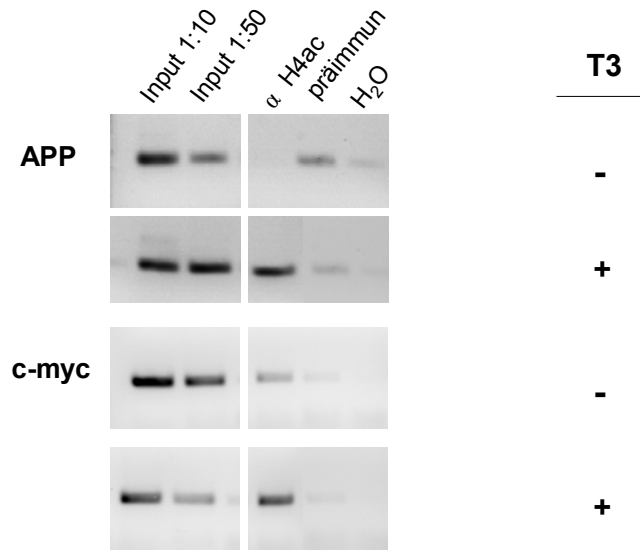


Abb. 4.9: Die Anwesenheit von T3 führt zur Zunahme der Histon H4-Acetylierung an kombinierten CTCF/TR-Bindestellen von APP und c-myc.

Für die ChIP-Analyse wurde Chromatin von N2aβ-Zellen, die in hormonfreiem Medium oder für 1 h in der Anwesenheit von 10^{-6} M T3 kultiviert wurden, verwendet. Der Zellextrakt wurde für die Präzipitation mit 5 µg anti H4ac-Antikörper oder 5 µl Präimmunserum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für die APP-CTS (APP) oder c-myc-Bindestelle A (c-myc). Für die PCR-Reaktion wurde je 1 µl des verdünnten Inputs (1:10, 1:50), der aufgereinigten Präzipitate (α H4ac, Präimmunserum) und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Template (H₂O) verwendet.

Die T3-regulierte Bindung des Corepressors Alien und die Histon H4-Acetylierung nach T3-Zugabe in Kombination mit den *in vitro*- und *in vivo*-DNA-Bindungsdaten führen zur Annahme, dass die murinen Gene APPβ und c-myc zwei neue kombinierte CTCF/TR-Bindestellen enthalten.

4.2 Episomen mit einem GFP-Reportergen als Modell zur Untersuchung der Enhancer-Blockade

Um den Einfluss von CTCF und TR auf die Enhancer-Blockade zu untersuchen und herauszufinden, wie T3 diesen Mechanismus beeinflussen kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modell für die Enhancer-Blockade etabliert. Es wurden bereits Plasmide in der transienten Transfektion in Zellkulturen eingesetzt, um die Enhancer-Blockade zu untersuchen. Jedoch haben transient transfizierte Plasmide den Nachteil, dass sie keine geordnete Chromatinstruktur ausbilden. Demgegenüber haben stabil integrierte Plasmide den Nachteil, dass sie dem Einfluss der Integrationsstelle unterworfen sind und durch die Integration zelluläre Funktionen beeinflussen können. Aus diesen Gründen wurden bereits extrachromosomale Plasmide mit viralen Regulationssequenzen, die nicht ins Wirtsgenom integrieren, aber dennoch eine geordnete Chromosomenstruktur ausbilden, zur Untersuchung der Enhancer-Blockade ausgewählt. Diese ermöglichen demnach die Analyse der transkriptionellen Regulation im Hintergrund geordneter Chromosomenstruktur unabhängig von einer Integrationsstelle im Genom.

Der episomale Vektor pREPH19-A besitzt einen viralen Replikationsursprung (ori) und ein nukleares Antigen, welche zusammen die extrachromosomale Replikation gewährleisten, sowie ein destabilisiertes GFP als Reportergen, dessen Halbwertszeit kürzer ist als die des wt GFPs (Abb. 4.10). Dies hat den Vorteil, dass Einflüsse auf den Reporter unmittelbar sichtbar werden. In den parentalen Vektor pREPH19-A wurde zwischen dem SV40-Enhancer und dem Promotor des dGFPs das sog. H19 Minigen kloniert, das die *Imprinting Control Region* (ICR) des H19/Igf2 Locus inklusive von vier CTS beinhaltet (Kanduri et al., 2000) (Abb. 4.10). Im Vektor pREPH19-A kann der Enhancer nicht nur das Hygromycin-Resistenzgen, das für eine mögliche Selektion wichtig ist, sondern auch das Reportergen aktivieren. Jedoch wird der Enhancer im Konstrukt pREPH19-B hinsichtlich der dGFP-Expression, aber nicht der Hygromycin-Resistenz, durch den dazwischen liegenden Isolator (ICR) blockiert.

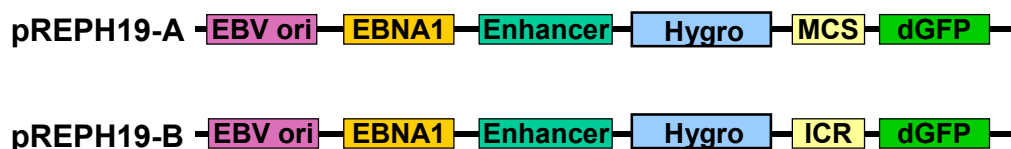


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Episomen mit GFP-Reportergen (Kanduri et al., 2000). Im episomalen Vektor pREPH19-A kann der Enhancer das Hygromycin-Resistenzgen und das dGFP-Reportergen aktivieren. Durch Positionierung der H19/Igf2 ICR mit vier CTS zwischen Enhancer und Promotor des dGFPs kann durch Bindung von CTCF die Expression des Reportergens blockiert werden. Der Epstein Barr-Virus ori (EBV ori) und das *nuclear antigen 1* (EBNA1) gewährleistet die extrachromosomale Replikation.

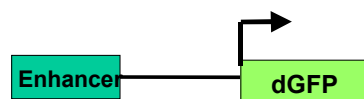
4.2.1 FACS-Analyse der Episomen mit GFP-Reportergen und ICR-Isolator

Die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade und ihre Modulationsmöglichkeiten können anhand des Reportergens getestet werden. Zellen, die dGFP exprimieren können mittels FACS-Analyse gezählt und ihre Expressionsrate anhand der Fluoreszenz ermittelt werden. Die Verwendung des destabilisierten GFPs verhindert eine Akkumulation in den Zellen. Für transiente Transfektionen in humane Choriokarzinoma-Zellen (JEG3) wurden der parentale episomale Vektor pREPH19-A und der Vektor pREPH19-B, der die CTS zwischen Enhancer und Promotor besitzt, verwendet. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für die FACS-Analyse geerntet. Der Hintergrund an Autofluoreszenz der Zellen wurde anhand der Analyse von mit Träger-DNA transfizierten Zellen gemessen und in einem Wertebereich R1 (siehe Abb. 4.11A) zusammengefasst. Eine Abbildung der gemessenen Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle im Koordinatensystem (X-Achse Intensität der Fluoreszenz gegen Y-Achse) war daraufhin möglich. Die Anzahl der Zellen, die sich in der Region R2 befinden (Bereich zwischen X-Achse und Region R1), entsprachen Zellen, die GFP exprimieren.

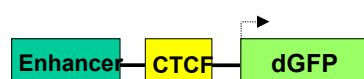
Es wurde beobachtet, dass die Transfektionen von Episomen keine einheitlichen Ergebnisse zeigten. Dieser Umstand wurde darauf zurückgeführt, dass die Transfektionseffizienz stark schwankte. In manchen Fällen konnte beobachtet werden, dass mehr Zellen, die mit Episomen ohne CTS transfiziert wurden, eine signifikante Fluoreszenz aufwiesen im Vergleich zu Zellen, die mit pREPH19-B Episomen (+CTS) transfiziert wurden (Abb. 4.11). Diese Verminderung an GFP-exprimierenden Zellen ist auf die Blockade des Enhancers durch CTCF zurückzuführen (Kanduri et al., 2000).

A

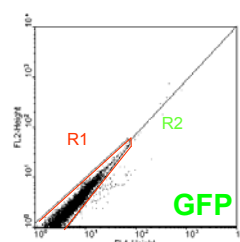
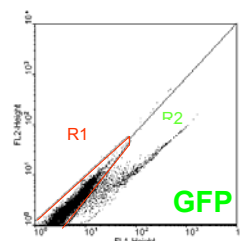
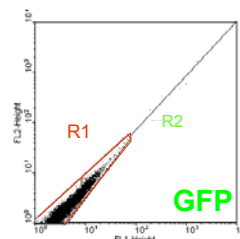
Träger-DNA



pREPH19-A (- CTS)



pREPH19-B (+ CTS)



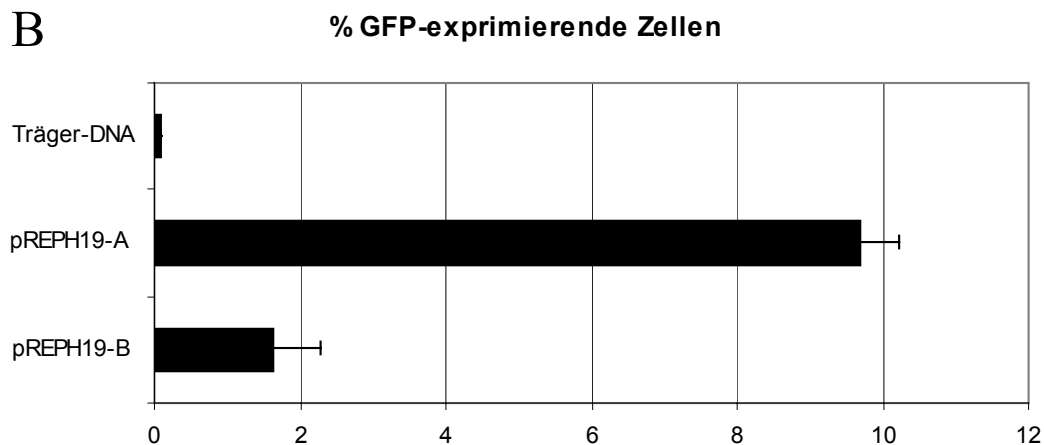


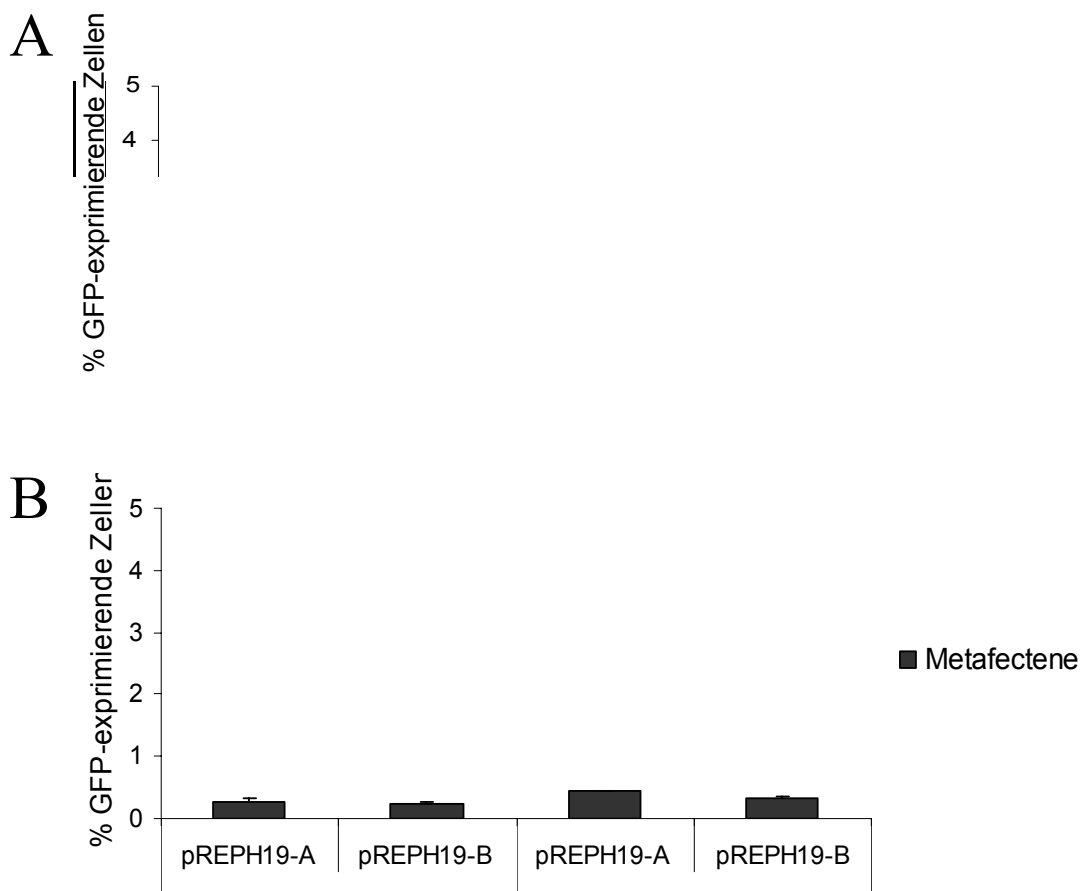
Abb. 4.11: FACS-Analyse der GFP-Episomen, Beispiel einer Transfektion mit hoher Effizienz.

Für die Transfektion wurden JEG-3-Zellen in 6wells ausgesät und mit 5 µg Episomen mittels FuGENE transfiziert. 48 h später wurden die Zellen geerntet und die GFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusscytometrie im FACS Calibur-Gerät gemessen. Es wurden jeweils 50.000 Zellen (Events) gezählt (A). Die Fluoreszenzintensität jeder Zelle, die im Kanal FL-1 gemessen wurde, ist im Dotplot dargestellt. Die Eigenfluoreszenz der mit Träger-DNA transfizierten Zellen wurde in der Region 1 (R1) zusammengefasst und gleich null gesetzt. In Region 2 (R2) wurden die GFP-exprimierenden Zellen gezählt. (B) Quantifizierung der GFP-exprimierenden Zellen in den verschiedenen Transfektionen

4.2.2 Optimierung der Transfektionseffizienz der GFP-tragenden Episomen

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass die Transfektionseffizienz von Episomen mittels FuGENE stark variierten. Damit die episomalen Vektoren mit GFP-Reportergen zur Untersuchung der Enhancer-Blockade verwenden zu können, musste die Transfektionseffizienz optimiert werden. Dies gewährleistet, dass auch geringe Einflüsse auf das Reportergen messbar sind. Humane Choriocarcinoma-Zellen wurden hierfür mit verschiedenen Methoden mit Episomen transfiziert und die Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen per FACS-Analyse ermittelt (siehe oben). Die in der Literatur am häufigsten verwendete Calciumphosphat-Methode unter Einsatz von verschiedenen Mengen an Episomen erzielte nur max. 2% GFP-exprimierende Zellen im Falle des pREPH19-A (Abb. 4.12A). Die Verwendung verschiedener Transfektionsmethoden, die auf dem Einschleusen fremder DNA durch Liposomen basiert (z.B. Metafectene), führte zu einer Transfektionseffizienz unter 1% (Abb. 4.12B). Diese geringe Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen konnte für weitere Untersuchungen nicht verwendet werden, da kein statistisch signifikanter Unterschied zur Eigenfluoreszenz der Zellen vorlag. Erst die Transfektion der Episomen mit dem Liposomenreagenz FuGENE führte zu einer Transfektionseffizienz über 2% (Daten nicht abgebildet). Um die Transfektionseffizienz noch weiter zu erhöhen, wurde daraufhin eine Cotransfektion der Episomen mit einem Vektor, der ein Puromycin-Resistenzgen trägt, durchgeführt. Nach der Transfektion mit FuGENE fand eine Selektion mit

Puromycin für 3 Tage statt, anschließend wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen ermittelt. Auf diese Weise konnte die höchste Transfektionseffizienz erzielt werden: die Transfektion des Vektors ohne CTS führte zu 10-12% GFP-exprimierenden Zellen, die unter Verwendung des Vektors mit CTS durch die Enhancer Blockade auf 2-8% GFP-exprimierende Zellen reduziert wurden (Abb. 4.12C). Da sich die Verwendung von 0,6 μ l FuGENE/ μ g Plasmid als optimal erwies, wurden diese Bedingungen für die weiteren Experimente gewählt.



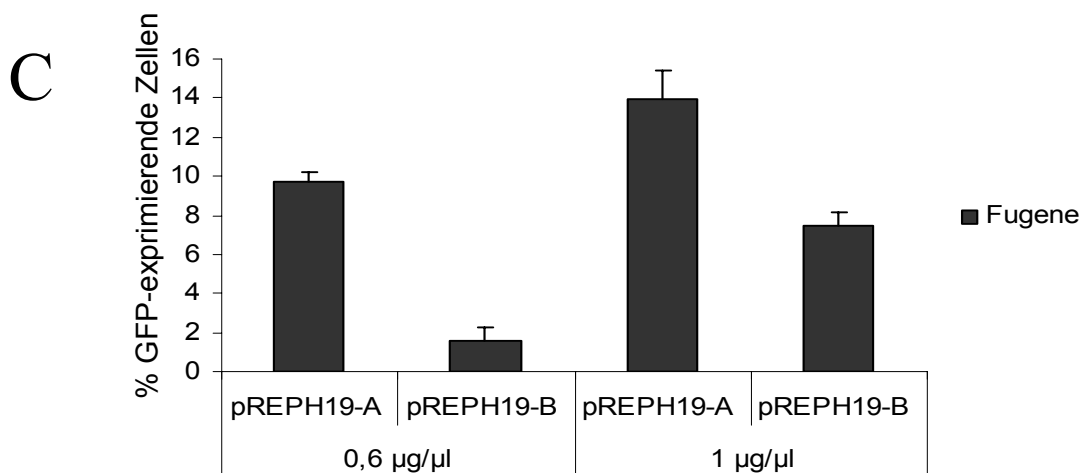


Abb. 4.12: Optimierung der Transfektionseffizienz anhand verschiedener Transfer-Methoden.

JEG3-Zellen wurden in 6wells ausgesät und mit der CaPO_4 -Methode (A), Metafectene (B) oder FuGene (C) entsprechend der Herstellerangaben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und im FACS-Gerät analysiert. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden ermittelt und quantifiziert. Für die FuGENE-Transfektion wurden neben 5 µg episomalem Vektor zusätzlich 1,7 µg Puromycin-Resistenzvektor (pPuro) cotransfiziert und anschließend für 3 Tage mit 1 µg Puromycin/ml Medium selektiert. Daraufhin wurden die Zellen geerntet und im FACS-Gerät analysiert.

4.2.3 JEG3-Zellen enthalten funktionellen TR

Für die weitere Nutzung des etablierten Transfektionssystems in humanen Choriocarcinoma-Zellen für die Untersuchung von kombinierten CTCF/TR-Bindestellen musste herausgefunden werden, ob diese Zellen funktionellen TR enthalten. Hierfür wurden JEG3-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das vor dem Luciferase-Reportergen Bindestellen für den TR besitzt. Der Einfluss eines möglicherweise vorhandenen TRs auf die Transkriptionsaktivität des Reporters kann somit nachgewiesen werden. Die Zellen wurden in Hormon-depletiertem Medium kultiviert und nach der Transfektion für 48 h mit bzw. ohne Hormon behandelt. Als Positivkontrolle wurde ein Expressionsvektor für TR cotransfiziert. Die Anwesenheit von TRIAC, einem T3-Analogon, führte zu starker Aktivierung des Reportergens sowohl in JEG3-Zellen als auch in den JEG3-Zellen, die mit TR cotransfiziert wurden (Abb. 4.13). Diese T3-bedingte Transaktivierung ist auf die Anwesenheit von funktionellem TR in JEG3-Zellen zurückzuführen. Somit kann das etablierte Transfektionssystem auch zur Untersuchung von TR/T3-Einflüssen auf die Enhancer-Blockade genutzt werden.

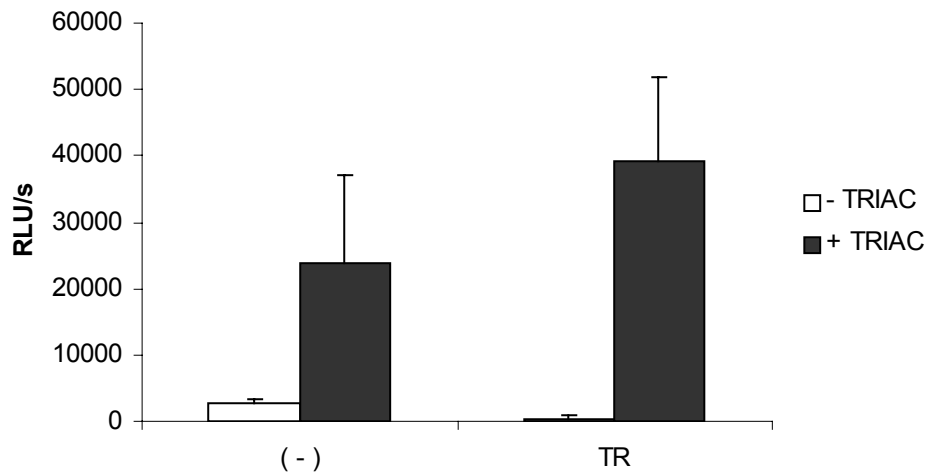


Abb. 4.13: JEG3-Zellen enthalten funktionellen TR.

JEG3-Zellen wurden in 6wells mit 1 μ g (DR4)₂tk-luc Reporterplasmid mit (TR) oder ohne (-) 0,2 μ g TR-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden in Hormon-depletiertem Medium oder in der Anwesenheit von 10^{-6} M TRIAC kultiviert und nach 48 h geerntet. Die Luciferaseaktivität wurde im Luminometer nachgewiesen.

4.2.4 FACS-Analyse nach Transfektion der GFP-tragenden Episomen mit kombinierten CTCF/TR-Bindestellen

Um den Einfluss von CTCF und TR auf die Enhancer-Blockade, die von zusammengesetzten Bindestellen ausgeübt wird, zu untersuchen, wurden die bereits publizierten Isolatoren des Hühner-Lysozyngens und des humanen c-myc-Gens herangezogen. F1F2 und TR-N wurden in beiden Orientierungen in den parentalen episomalen Vektor pREPH19-A analog zur murinen ICR (pREPH19-B) kloniert, sodass diese Isolatoren zwischen SV40-Enhancer und Promotor des GFP-Gens positioniert sind und in der Lage sein sollten, Enhancer-Blockade auszuüben (Abb. 4.14).

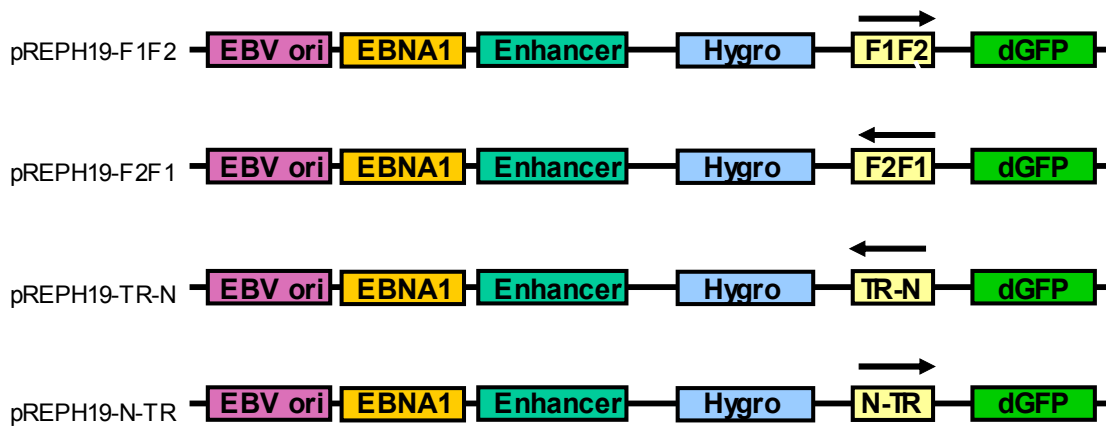


Abb. 4.14: Schematische Darstellung der GFP-tragenden Episomen mit kombinierten CTCF/TR-Bindestellen.

In den episomalen Vektor pREPH19-A wurden die CTCF/TR-Bindestellen des humanen c-myc-Gens (N-TR) und des Hühner-Lysozymgens (F1F2) zwischen Enhancer und Promotor des dGFP-Reportergens kloniert. Die Integration erfolgte in beiden Orientierungen. Im Falle einer Enhancer-Blockade durch die Isolatorelemente sollte der Enhancer für das Reportergen blockiert werden.

Zuerst wurde der Einfluss von T3 auf die Vektoren pREPH19-A/B untersucht, die keine TR-Bindestellen besitzen, um sicherzustellen, dass etwaige Hormoneffekte unter Verwendung der CTCF/TR-Episomen tatsächlich auf die Bindung von TR zurückzuführen sind. JEG3-Zellen wurden mit pREPH19-A/B transfiziert und vor Analyse der Zellen im FACS für 48 h mit TRIAC behandelt oder ohne Hormon kultiviert. Bei der Ermittlung der Anzahl der fluoreszierenden Zellen ergab sich ein Unterschied zwischen der Behandlung der Zellen mit und ohne Hormon (Abb. 4.15). Daher müssen diese Vektoren bei weiteren Experimenten als Kontrolle verwendet werden. Nur ein Hormoneffekt, der signifikant über dem beobachteten T3-Effekt auf pREPH19-A/B liegt, kann auf ein vorhandenes TRE zurückgeführt werden.

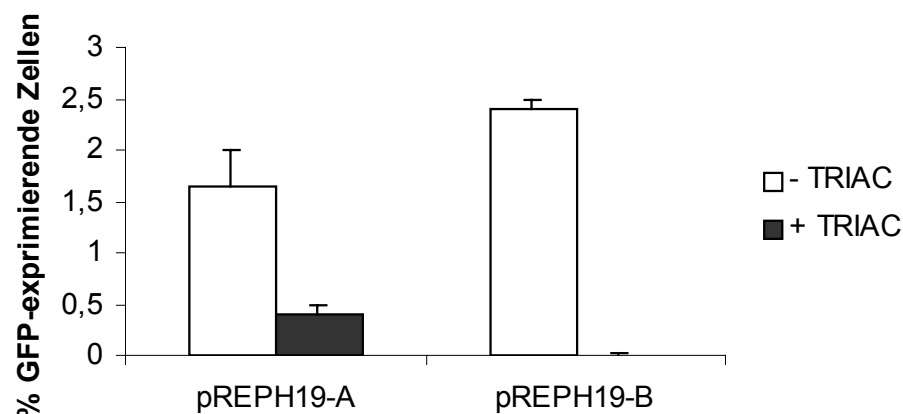


Abb. 4.15: T3 hat einen Einfluss auf die episomalen Vektoren ohne TR-Bindestelle

JEG3-Zellen wurden in 6wells ausgesät, mit FuGENE transfiziert und für 3 Tage mit Puromycin selektioniert. Nach 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M TRIAC wurden die Zellen geerntet und im FACS-Gerät analysiert. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden ermittelt und quantifiziert.

Für die Untersuchung der durch die zusammengesetzten CTCF/TR-Bindestellen vermittelte Enhancer-Blockade wurden JEG3-Zellen mit den Episomen pREP-F1F2, pREP-F2F1, pREP-TR-N und pREP-N-TR transfiziert und für 48 h mit oder ohne Hormon kultiviert. Die FACS-Analyse der GFP-exprimierenden Zellen ergab uneinheitliche Ergebnisse mit hohem statistischem Fehler. In einigen Fällen war zu beobachten, dass Zellen, die mit CTCF/TR-Bindestellen enthaltenden Vektoren transfiziert wurden, in Abwesenheit von Hormon im Vergleich zum pREPH19-A weniger GFP-Expression aufwiesen. Diese Enhancer-Blockade erwies sich in einigen Fällen auch als hormonsensitiv, sodass die Inkubation mit TRIAC zu einer Erhöhung der Reporterogenaktivität führte (Daten nicht abgebildet). Jedoch waren diese Ergebnisse nicht immer zu beobachten und die Transfektionseffizienz sank trotz Cotransfektion des Puromycin-Resistenzvektors auf unter 2% (Abb. 4.16). Daher wurde im Folgenden versucht, ein Modellsystem zu etablieren, das sich zur reproduzierbaren Untersuchung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade eignet.

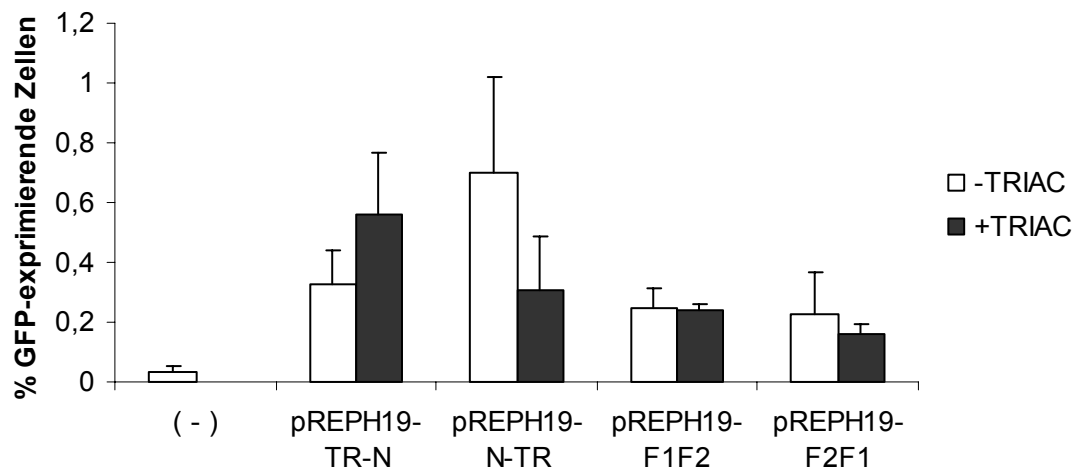


Abb. 4.16: Transfektion von Episomen mit zusammengesetzten TR/CTCF-Bindestellen

JEG3-Zellen wurden in 6wells ausgesät und mittels FuGene mit 5 µg Episom und 1,7 µg pPuro transfiziert. Nach 3tägiger Puromycin-Selektion (1 µg/ml Medium) wurden die Zellen geerntet und im FACS-Gerät analysiert. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden ermittelt und quantifiziert.

4.3 Episomen mit Luciferase-Reportergen als Modell zur Untersuchung der Enhancer-Blockade

Um eine weitere und reproduzierbarere Analysemethode basierend auf dem episomalen System zur Untersuchung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade zu etablieren, wurde der kommerzielle Vektor pREP4 verwendet. Zuerst wurden verschiedene CTCF/TR-Bindestellen in ein Derivat des kommerziellen Vektor *pGL3-Control* ($p3\alpha$) so eingefügt, dass der jeweilige Isolator zwischen SV40-Enhancer und -Promotor liegt. Anschließend wurde aus diesem Vektor der Bereich ausgeschnitten, der Enhancer, Isolator und Luciferase-Reportergen enthält. Dieser Sequenzabschnitt wurde in den Vektor pREP4 kloniert, dem zuvor der RSV-Promotor sowie die Polyadenylierungsstelle entfernt worden war (pREP4-ss). Der Kontrollvektor pREP-Luc entstand durch Einfügen des SV40-Enhancers und -Promotors des $p3\alpha$ in den pREP4-Vektor und enthielt folglich keine CTCF/TR-Bindestelle. Analog wurden die Konstrukte teilweise auch ohne Enhancer kloniert. Dies wurde durch Herausschneiden der Inserts aus dem $p3\alpha$ -Vektor ohne SV40-Enhancer gewährleistet (Abb. 4.17).

4.3.1 Episomale Vektoren mit möglicher kombinierter CTCF/TR-Bindestelle des murinen APP β -Promotors

Für eine funktionelle Analyse der bereits hinsichtlich der Bindung von CTCF und TR charakterisierten Bindestellen des murinen APP β -Promotors (siehe 4.1) in Bezug auf Ausübung der Enhancer-Blockade, wurden diese Bindestellen als Monomer oder multimerisiert über Subklonierung mittels des $p3\alpha$ -Vektors in den parentalen Vektor pREP4 kloniert. Als Kontrolle für den Einfluss der CTCF-Bindung wurde ebenfalls die bereits charakterisierte CTS-Mutation (siehe 4.1.3) in das episomale System kloniert (Abb. 4.17).

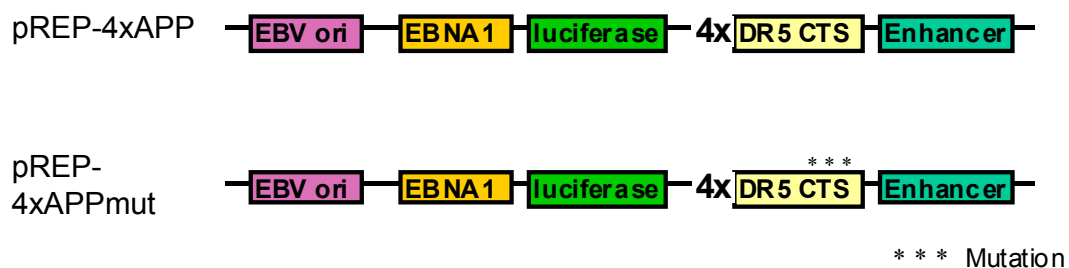


Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Luciferase-Episomen mit kombinierten CTCF/TR-Bindestelle des murinen APP β Promotors.

In den $p3\alpha$ -Vektor wurde die wt oder mutierte CTCF/TR-Bindestelle des murinen APP β -Promotors zwischen SV40-Enhancer und Promotor des Luciferase-Reportergens kloniert. Das Enhancer-Isolator-Promotor-Gen-Element wurde daraufhin ausgeschnitten und in den episomalen Vektor pREP4 kloniert. Sterne repräsentieren 3 Nukleotide, die innerhalb der CTS ausgetauscht wurden und so die CTCF-Bindung verhindern.

4.3.2 CTCF/TR-Bindestellen im APP β -Promotor vermitteln eine Zelltyp-spezifische Enhancer-Blockade im episomalen System

Zunächst wurden die Episomen mit den APP-Bindestellen transient in N2a β -Zellen eingebracht und der Einfluss der CTCF/TR-Bindestellen auf das Reportergen zunächst in Abwesenheit von Hormon untersucht. Im Vergleich zur Luciferase-Expression von pREP-Luc war bei Verwendung der Episomen mit APP-CTCF/TR-Bindestellen immer eine niedrigere Expression zu beobachten (Abb. 4.18). Dies ist auf eine Enhancer-Blockade zurückzuführen.

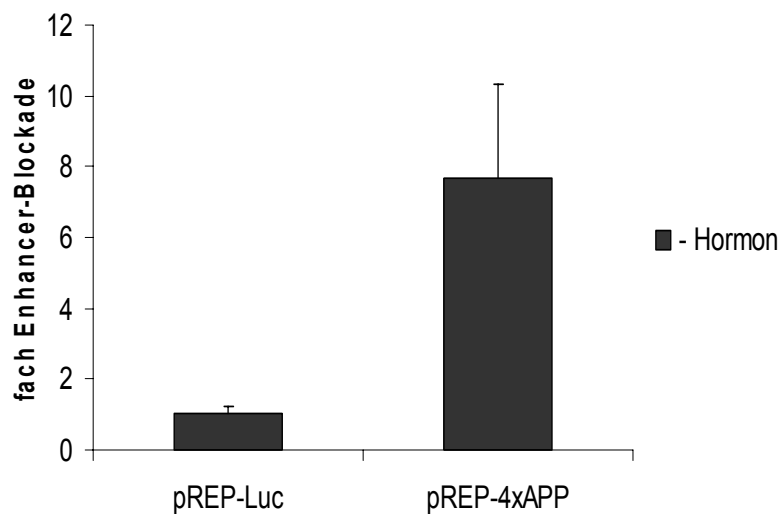


Abb. 4.18: Die kombinierte CTCF/TR-Bindestelle des murinen APP β -Promotors vermittelt im episomalen System Enhancer-Blockade.

N2a β -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. 48 h später wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (pREPluc) wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-4xAPP ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

Da für CTCF ein aktivierender Einfluss auf die APP-Expression in COS-1-Zellen beschrieben wurde (Vostrov and Quitschke, 1997), wurden die murinen APP-Episomen auch in diese Zelllinie transfiziert. Hier führte die Anwesenheit der CTCF/TR-Bindestelle im Vergleich zum pREP-Luc Vektor nicht zur Enhancer-Blockade, sondern zu einer Aktivierung der Luciferase-Expression (Abb. 4.19). Damit ist dieses Ergebnis konform mit früheren Studien, die eine Aktivierung durch CTCF beschreiben. Die Regulierung der APP-Expression durch CTCF scheint somit zelltyp-spezifisch zu sein.

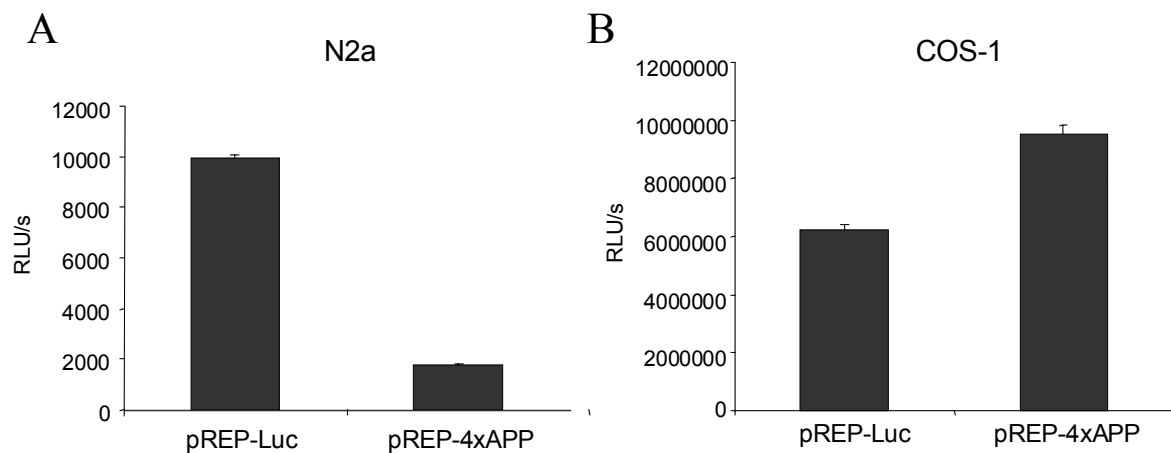


Abb. 4.19: APP-CTCF/TR-Bindestellen vermitteln eine Zelltyp-abhängige Enhancer-Blockade im episomalen System

N2aβ- und COS-1-Zellen wurden in *6wells* in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. 48 h später wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

Nachdem gezeigt wurde, dass die APP-CTCF/TR-Bindestelle Enhancer-Blockade im episomalen System vermittelt, sollte der Einfluss der CTCF-Bindung auf diesen Mechanismus untersucht werden. Unter Verwendung der Episomen mit mutierter CTCF- und wt TR-Bindestelle konnte gezeigt werden, dass CTCF für die Enhancer-Blockade verantwortlich ist, da die mutierte CTS (vgl. Abschnitt 4.1.3) keine Enhancer-Blockade zeigte (Abb. 4.20).

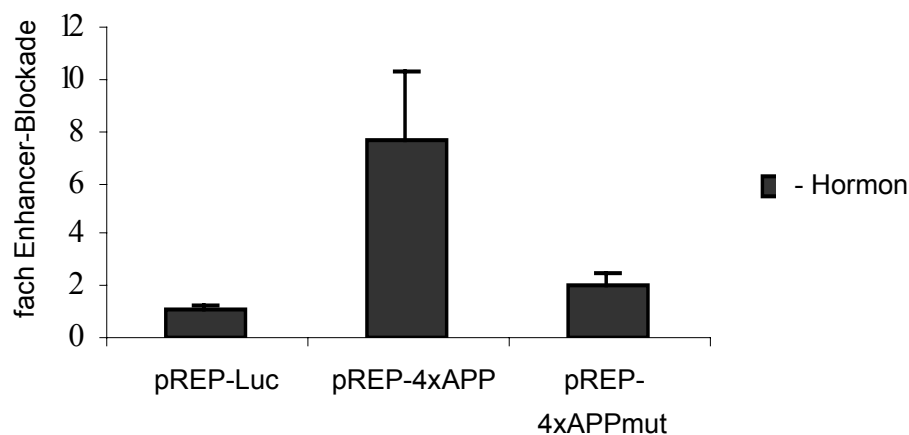


Abb. 4.20: Die CTCF-Bindung ist für die durch APP vermittelte Enhancer-Blockade in N2aβ-Zellen notwendig.

N2aβ-Zellen wurden in *6wells* in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. 48 h später wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (pREP-Luc) wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-APP und pREP-APPmut ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.3.3 CTCF/TR-Bindestellen im APP β -Promotor zeigen keine hormonsensitive Enhancer-Blockade im episomalen System

Um zu untersuchen, ob im murinen APP β ein funktionelles Zusammenspiel der CTCF- und TR-Bindestellen hinsichtlich der Enhancer-Blockade existiert, wurden in einer Reihe von Ansätzen die APP-Episomen zusammen mit verschiedenen Rezeptoren (TR, RXR, RAR, LXR) transfiziert und mit den entsprechenden Liganden inkubiert. Anschließend wurde die Luciferase-Expression gemessen und berechnet, ob die Anwesenheit von Hormon im Vergleich zur Abwesenheit von Hormon zu einem Anstieg der Genexpression führt. Dies würde einer Aufhebung der Enhancer-Blockade durch Hormon entsprechen, wie es bereits für das zusammengesetzte F1F2-Element des Hühner-Lysozyngens beschrieben wurde (Lutz et al., 2003). Jedoch ergab die Untersuchung der verschiedenen Rezeptoren und Liganden unter Verwendung verschiedener Mengen, Zeiten und Zellen keinen reproduzierbaren Hormoneffekt auf die durch CTCF vermittelte Enhancer-Blockade (Daten nicht abgebildet). Somit ist bis hier nicht klar, ob sich im murinen APP β -Promotor ein funktionelles TRE befindet und ob es einen Einfluss auf die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade besitzt.

4.3.4 Episomale Vektoren mit kombinierter CTCF/TR-Bindestelle des Hühner-Lysozyngens

Die genauere Charakterisierung einer bereits definierten CTCF/TR-Bindestelle hinsichtlich der hormonsensitiven Enhancer-Blockade erfolgte mittels des episomalen Systems. Hierfür wurden die CTCF- und TR-Bindestellen des Hühner-Lysozyngens (F1F2) als Monomer oder multimerisiert in den episomalen Vektor pREP-Luc zwischen SV40-Enhancer und -Promotor kloniert. Um eine durch CTCF vermittelte Genrepression dokumentieren zu können, wurden alle Konstrukte auch ohne SV40-Enhancer hergestellt. Hierdurch konnte nun unterschieden werden, ob eine verminderte Genexpression auf eine Promotorrepression (Konstrukt ohne Enhancer) oder Enhancer-Blockade (Konstrukt mit Enhancer) zurückzuführen ist (Abb. 4.21; siehe auch Diskussion).

pREP-F1F2

pREP-F1F2
-enh

pREP-5xF1F2

Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Luciferase-Episomen mit kombinierten CTCF/TR-Bindestelle des Hühner-Lysozymsilencers

In den p3 α -Vektor wurde die monomere oder multimerisierte CTCF/TR-Bindestelle des Hühner-Lysozymsilencers zwischen SV40-Enhancer und Promotor des Luciferase-Reportergens kloniert. Das Enhancer-Isolator-Promotor-Gen-Element oder Isolator-Promotor-Gen-Element wurde daraufhin ausgeschnitten und in den episomalen Vektor pREP4-ss kloniert.

4.3.5 F1F2 vermittelt Enhancer-Blockade und Aufhebung der Enhancer-Blockade auf Episomen

Da alle bisherigen Studien entweder am endogenen Lysozymlocus oder mit ins Genom integrierter DNA durchgeführt wurden, musste zunächst getestet werden, ob F1F2 im episomalen System eine hormonsensitive Enhancer Blockade ausübt. Hierfür wurden die verschiedenen episomalen Reporterkonstrukte in N2a β -Zellen eingebracht und anschließend für 48 h ohne Hormon oder in Anwesenheit von 10^{-6} M T3 kultiviert. Nach Ernte der Zellen wurde über die Luciferase-Expression im Vergleich zum episomalen Vektor ohne CTCF/TR-Bindestellen das Ausmaß der Enhancer-Blockade ermittelt. Das F1F2-Element führte ohne Hormon zu einer ca. 3fachen Enhancer-Blockade, während die multimerisierte Bindestelle sogar eine etwa 20fache Blockade ausübte (Abb. 4.22). In beiden Fällen führte die Inkubation mit T3 zu einer vollständigen Aufhebung der Enhancer-Blockade. Dies bedeutet, dass das episomale System den endogenen Locus imitiert und diese Vektoren zur genaueren Analyse der hormonsensitiven Enhancer-Blockade genutzt werden können.

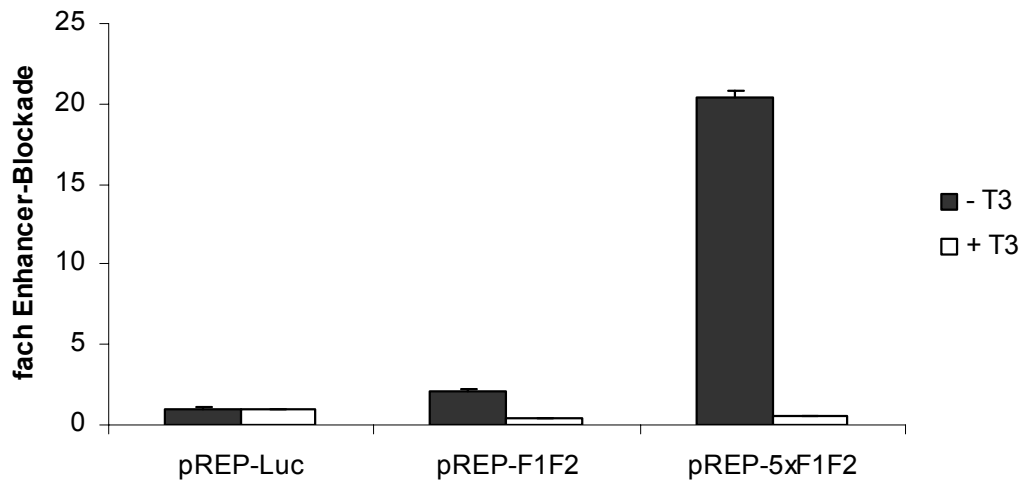


Abb. 4.22: F1F2 vermittelt hormonsensitive Enhancer-Blockade in episomalen Vektoren

N2a β -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-F1F2 und -5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

Um den Einfluss von CTCF auf die Luciferase-Aktivität durch Genreprimierung zu untersuchen, wurden die Vektoren ohne Enhancer transfiziert und die Intensität der Repression (-enh) und der Enhancer-Blockade (+enh) gegenübergestellt. Es wurde beobachtet, dass CTCF im episomalen System 2fach (F1F2) bzw. 4fach (5xF1F2) Repression ausübt, die aber durch die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade jeweils deutlich übertroffen wird (Abb. 4.23). Der Hauptanteil an negativer Regulation in diesem System macht damit die Enhancer-Blockade aus.

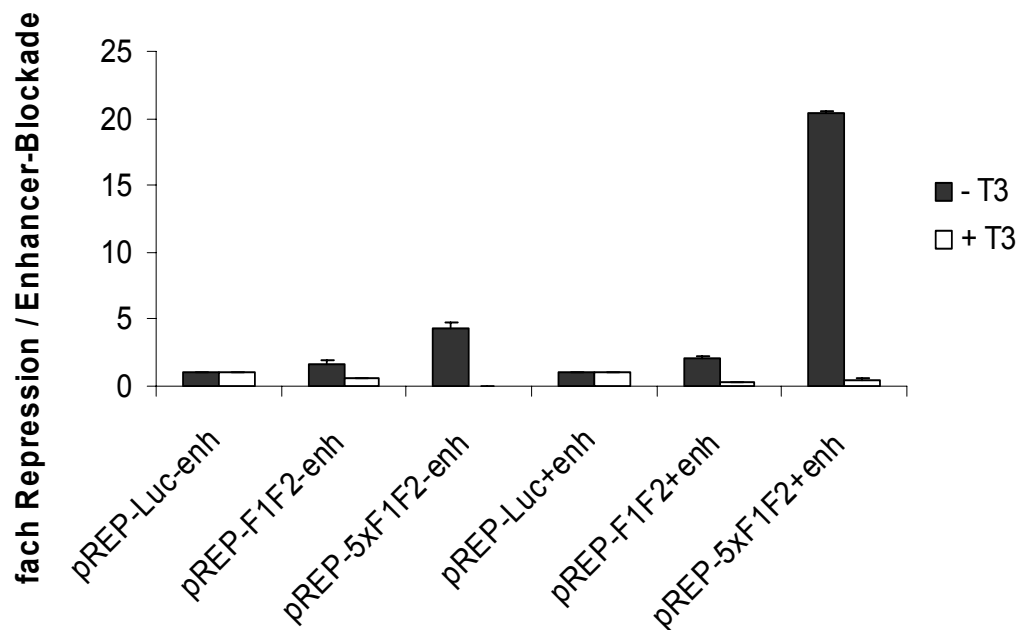


Abb. 4.23: Die durch F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade überwiegt den Repressionseffekt.

N2a β -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (pREP-Luc-enh/pREP-Luc+enh) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-F1F2+enh und -5xF1F2+enh bzw. Repression pREP-F1F2-enh und pREP-5xF1F2-enh ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

Da bei Transfektionen der Episomen mit APP β -Bindestellen zellspezifische Unterschiede in der Enhancer-Blockade zu beobachten waren, wurden die F1F2-enhaltenden Episomen ebenfalls in verschiedene Zelllinien eingebracht. Augenscheinlich war, dass F1F2 in einer Reihe von Zellen eine hormonsensitive Enhancer-Blockade ausübt, die sich nur hinsichtlich der Blockade-Intensität voneinander unterschied (2-4fach) (Abb. 4.24). In JEG3-Zellen jedoch, die für die Transfektion von GFP-Episomen verwendet wurden, war eine sehr starke Enhancer-Blockade zu beobachten, die aber nicht durch T3 aufgehoben werden konnte (Abb. 4.24B). Da JEG3-Zellen funktionellen TR enthalten (siehe 4.1), ist die konstitutive Enhancer-Blockade vermutlich auf eine andere Zusammensetzung an Cofaktoren in dieser Zelllinie zurückzuführen.

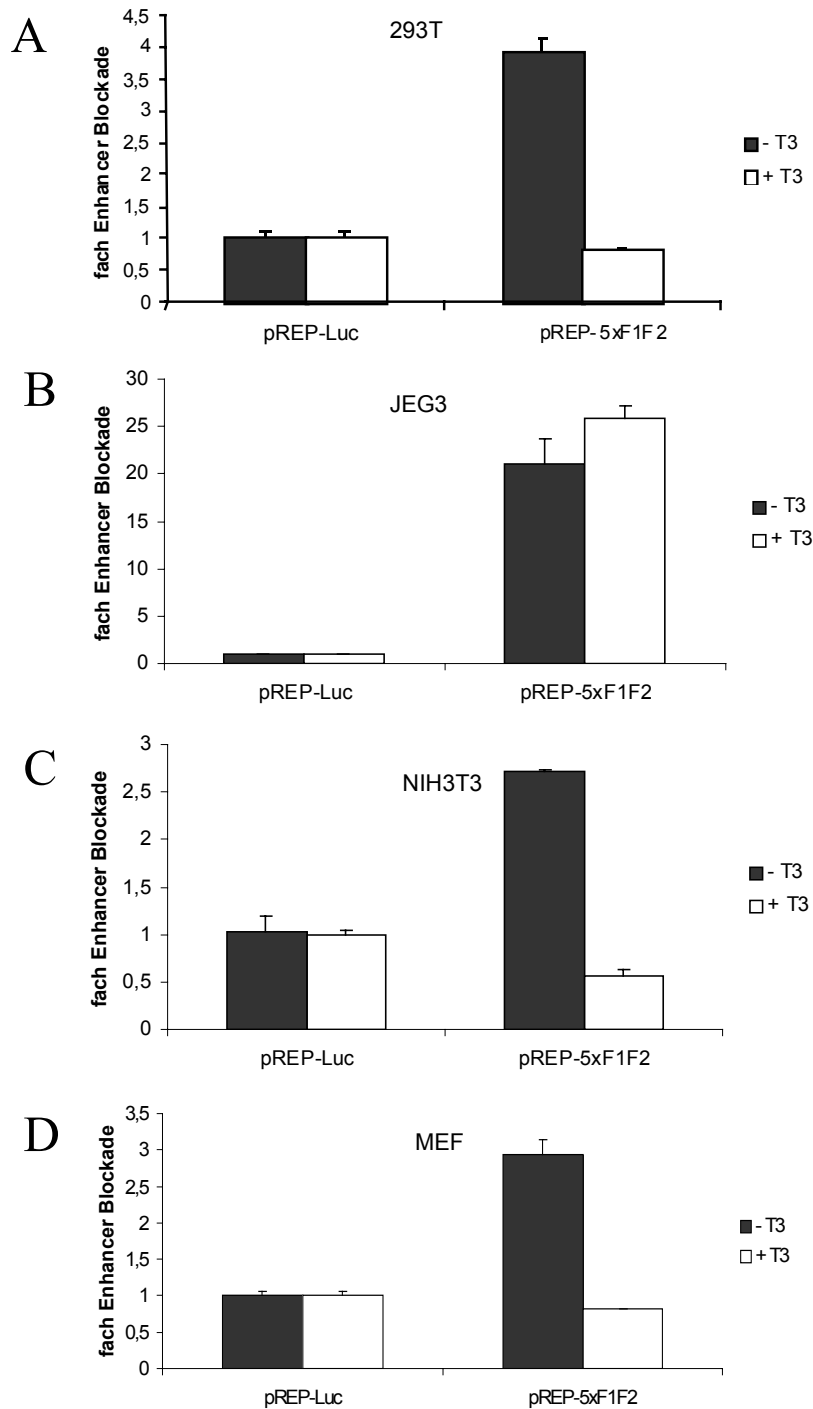


Abb. 4.24: Die Intensität der F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade variiert in verschiedenen Zelllinien.

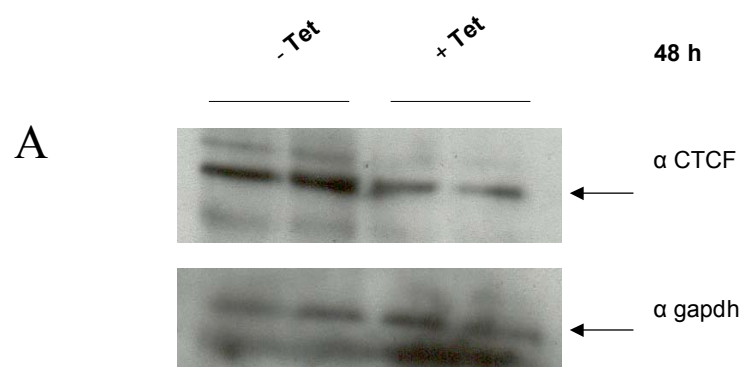
293T- (A), JEG3- (B), NIH3T3- (C) und MEF-Zellen (D) wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Für 293T-, JEG3- und NIH3T3-Zellen wurde die CaPO₄-Methode angewandt, wohingegen MEF-Zellen mit JetPEI transfiziert wurden. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10⁻⁶ M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xT1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.4 Episomales Chromatin erlaubt die Analyse der Enhancer-Blockade

Es wurde bereits mit stabil integrierten Plasmiden, die das F1F2-Element tragen, gezeigt, dass die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade T3-sensitiv ist (Lutz et al., 2003). Nun konnten diese Ergebnisse auch im episomalen System bestätigt werden (siehe oben) und das System für weitere Analysen genutzt werden.

4.4.1 Knock-down von CTCF führt zu einer Senkung der F1F2-vermittelten Enhancer-Blockade

Eine Senkung der CTCF-Proteinmenge kann auf RNA-Ebene durch siRNA vermittelt werden. Da eine Langzeit-Herunterregulierung von CTCF negative Konsequenzen für die Zelle hat (Rasko et al., 2001), wurde eine durch Tetrazyklin regulierbare Expression der Haarnadelschleifen-RNA gewählt. Nach Transfektion der episomalen Vektoren in 293T-Zellen, die stabil mit dem induzierbaren siRNA-System gegen CTCF transfiziert wurden, erfolgte die Induktion durch Tetrazyklin für 24 oder 48 h. Zur Kontrolle des *Knock-downs* wurden parallel Zellen für den Nachweis der CTCF- Proteinmenge einem Western Blot unterzogen. Die CTCF-Proteinmenge war nach 48 h auf ca. 50% reduziert (Abb. 4.25A) und hatte eine Reduktion der CTCF-vermittelten Enhancer-Blockade um ca. 50% zur Folge (Abb. 4.25B). Dies legt die Vermutung nahe, dass CTCF für die Vermittlung der Enhancer-Blockade im episomalen System verantwortlich ist.



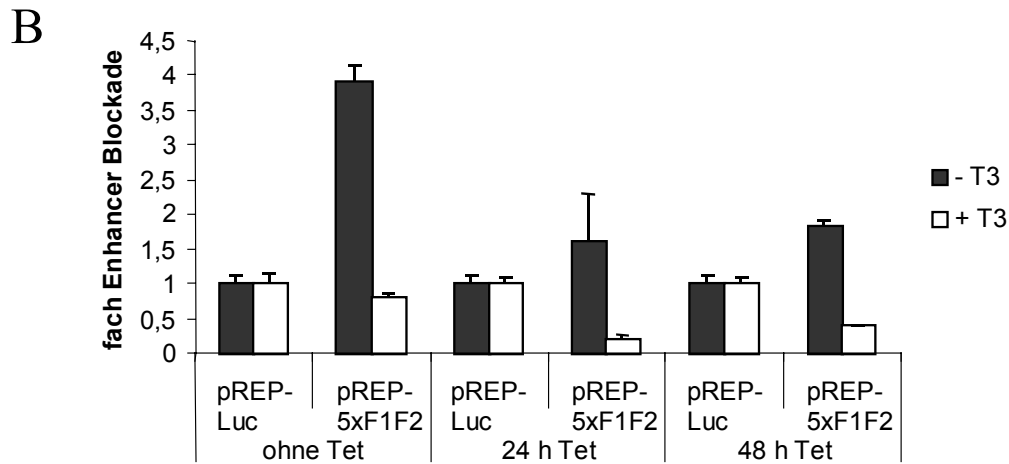


Abb. 4.25: Die F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade wird durch CTCF *Knock-down* vermindert.

(A) 293T-Zellen, die stabil das Tet-induzierbare siRNA-System gegen CTCF integriert haben, wurden in 6wells kultiviert und für 48 h mit Tet induziert oder nicht behandelt. Anschließend wurde daraus Ganzzellextrakt gewonnen und für einen Western Blot eingesetzt. Um die CTCF-Proteinmenge nachzuweisen, wurde ein anti CTCF-Antikörper eingesetzt. Die gleiche Ladung der Proben wurde unter Verwendung eines Antikörpers gegen das ubiquitär exprimierte Protein GAPDH demonstriert.

(B) 293T-Zellen, die stabil das Tet-induzierbare siRNA-System gegen CTCF integriert haben, wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit der CaPO₄-Methode mit 1 µg episomalen Reporter und 0,2 µg TR-Expressionsvektor transfiziert. Nach 48 h Kultivierung in An- oder Abwesenheit von 10⁻⁶ M T3 wurden die Zellen, die entweder durch Tet induziert wurden oder ohne Tet wuchsen, geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (pREP-Luc) in der An- und Abwesenheit von T3 und Tet wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

Dieses Ergebnis konnte auch in transienten siRNA-Experimenten und Cotransfektion von F1F2-enthaltenden Episomen bestätigt werden. Dies bedeutet, dass nicht das stabil in 293T-Zellen integrierte siRNA-System verwendet wurde, sondern auf eine transiente Transfektion des Tet-Repressors und des siRNA-exprimierenden Vektors in 293T-Zellen zurückgegriffen wurde. Hierfür wurde der durch siRNA-bedingte *Knock-down* von CTCF in den Zellen für 72 h durch Tetracyclin induziert. Im Vergleich zu nicht mit siRNA-behandelten Zellen konnte hier eine völlige Aufhebung der Enhancer-Blockade beobachtet werden (Abb. 4.26).

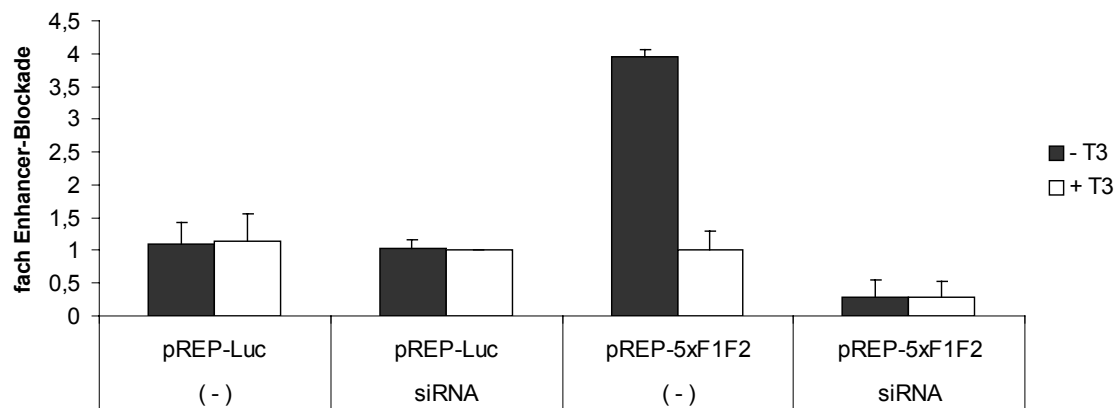


Abb. 4.26: Die F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade wird durch einen transienten CTCF *Knock-down* über 72 h völlig aufgehoben.

293T-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit der CaPO₄-Methode mit 0,5 µg pCDNA6-TR, 0,5 µg pSUP-siRNA2, 1 µg episomalen Reporter und 0,2 µg TR-Expressionsvektor transfiziert. Nach 72 h Kultivierung in An- oder Abwesenheit von 10⁻⁶ M T3 wurden die Zellen, die entweder durch Tet induziert wurden oder ohne Tet wuchsen, geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 und siRNA wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.4.2 Überexprimierung von CTCF erhöht die Enhancer-Blockade

Die Herunterregulierung von CTCF hat zur Folge, dass die Enhancer-Blockade abnimmt. Um noch weitergehend zu bestätigen, dass CTCF der Faktor ist, der die Enhancer-Blockade ausübt, wurde nun der Einfluss einer CTCF-Überexprimierung auf dieses System untersucht. Hierfür wurde ein Expressionsvektor für CTCF zusammen mit dem episomalen Reporterkonstrukt in N2a-Zellen eingebracht. Um einen möglichen Anstieg in der Enhancer-Blockade zu beobachten, wurden Konditionen gewählt, bei denen die Enhancer-Blockade, die durch das endogenes CTCF vermittelt wird, nicht gesättigt ist, d.h. eine vergleichsweise niedrige Enhancer-Blockade messbar ist. Die Zellen wurden nach Transfektion für 48 h mit Hormon behandelt oder ohne Hormon kultiviert. Die Cotransfektion mit einem Expressionsvektor für CTCF führte zu einem signifikanten, etwa 5fachem, Anstieg in der Enhancer-Blockade (Abb. 4.27).

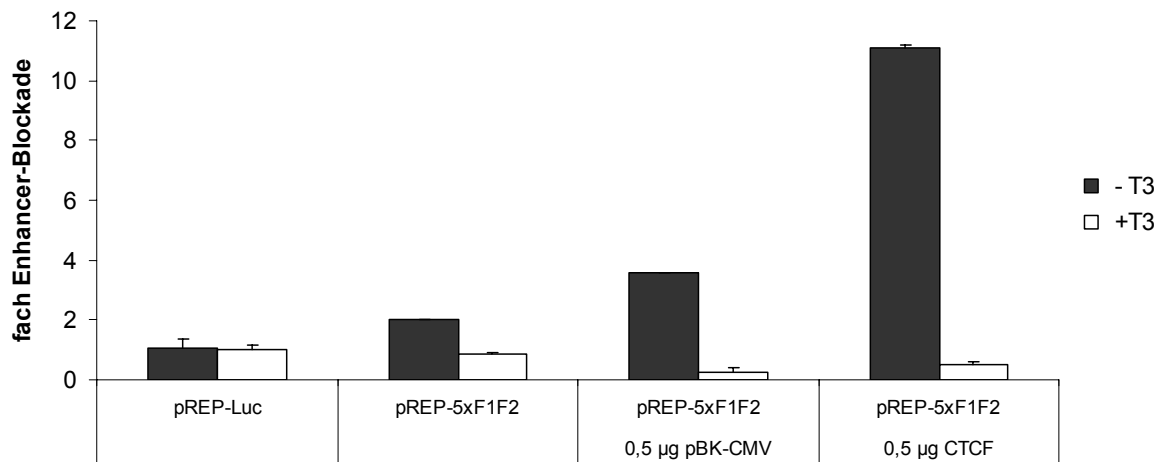


Abb. 4.27: CTCF-Überexpression erhöht die F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade

N2aβ Zellen wurden in 6well/s in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden 0,5 µg pBK-CMV oder pBK-CMV-CTCF (Expressionsplasmid für CTCF) cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrollexperimentes (pREP-Luc) in der An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

Auch in dem zuvor verwendeten transienten siRNA-System in 239T-Zellen, das zu Knock-down von CTCF und Aufhebung der Enhancer-Blockade führte, konnte die erneute Expression von CTCF die Enhancer-Blockade wiederherstellen (Abb. 4.28). Diese Ergebnisse bestätigen, dass in der Tat CTCF einer der Faktoren ist, die für die Enhancer-Blockade verantwortlich sind.

Die Kombination von siRNA gegen humanes CTCF und Expressionsvektor für Hühner-CTCF in Cotransfektionen mit episomalen Reportern erlaubt in Zukunft die Analyse von CTCF-Varianten wie Punkt- oder Deletionsmutanten.

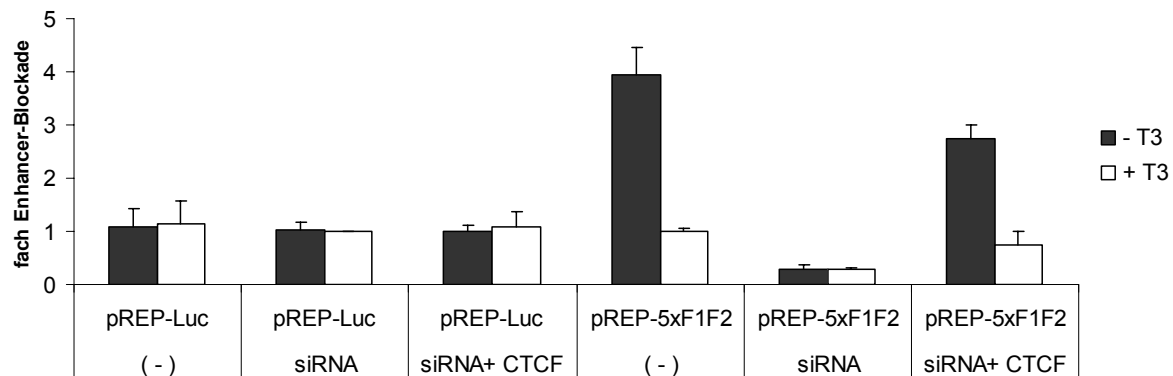


Abb. 4.28: CTCF-Expression stellt die durch CTCF-Knock down aufgehobene Enhancer-Blockade wieder her.

293T-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit der CaPO₄-Methode mit 0,5 µg pCDNA6-TR, 0,5 µg pSUP-siRNA2, 1 µg episomalen Reporter, 0,2 µg TR-Expressionsvektor und teilweise 0,5 µg CTCF-Expressionsvektor transfiziert. Nach 72 h Kultivierung in An- oder Abwesenheit von 10⁻⁶ M T3 wurden die Zellen, die entweder durch Tet induziert wurden oder ohne Tet wuchsen, geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 und siRNA wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.4.3 Stabile F1F2-Episomen Zellklone zeigen unterschiedliche Aktivierung durch T3

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die anfängliche Zahl von mehreren hundert Episomen pro transfizierter Zelle durch Selektion mit einem geeigneten Antibiotikum und Etablierung stabiler Klone, auf wenige Episomen pro Zelle sinkt, ohne dass die Episomen im Genom integrieren. Um Zellen zu etablieren, die nur wenige Episomen besitzen und daher mehr die natürliche Genanordnung von zwei Kopien widerspiegeln, wurden stabile Zellklone hergestellt. Hierfür wurden die episomalen Vektoren in N2a-Zellen transfiziert. Nach Selektion der, mit den verschiedenen Episomen transfizierten, N2a-Zellen mit Hygromycin für 3 Wochen wurden einzelne Klone isoliert. Da in diesen N2a-Klonen kaum TR exprimiert wird, wurden in einer zweiten Transfektion und Selektionsrunde ein Expressionsvektor für TRβ und der Vektor pBK-CMV, der ein weiteres Resistenzgen (G418) besitzt stabil integriert. Nach erneuter 3-wöchiger Selektion wurden einzelne Klone isoliert, für 48 h mit T3 behandelt oder ohne Hormon kultiviert und die Aktivität der Luciferase bestimmt. Zunächst wurde beobachtet, dass die Klone unterschiedliche starke Reporter-gen-Aktivierung durch T3 aufwiesen (Abb. 4.29). Einige Klone zeigten überhaupt keine T3-Antwort. Dies würde für eine Integration der Episomen an unterschiedliche Stellen im Genom sprechen. Des Weiteren konnte in einigen Klonen keine Luciferaseaktivität gemessen werden, was erneut auf eine stabile Integration im Genom oder auf eine Methylierung, und somit Stilllegung, der

Episomen zurückzuführen sein könnte. Sowohl von der Integration von Episomen ins Genom als auch von der Methylierung von Episomen wurden von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Holmgren et al., 2001) (F. Fackelmayer, nicht publiziert). Zwei Klone (4I, 4III) zeigten im Vergleich zu den pREP-Luc Klonen eine verminderte Luciferaseaktivität ohne Hormon und eine relativ starke Antwort auf T3, was einer Aufhebung der Enhancer-Blockade entsprechen könnte (Abb. 4.29).

Um herauszufinden, ob sich in den stabilen Zellklonen noch intakte Episomen befinden, wurde der sog. Hirt's Extrakt isoliert. Bei dieser Extraktionsmethode findet eine Anreicherung von Minichromosomen im Überstand statt. Dieser Überstand wurde einer bakteriellen Transformation unterzogen. Nur intakte Plasmide im Hirt's Extrakt führen zum Wachstum von Bakterienklonen. Diese Bakterienklone sollten dann Rückschlüsse auf intakte Episomen zulassen. In der Tat konnten einige wenige Bakterienklone präpariert werden, aus denen die Plasmide isoliert wurden. Jene wurden charakteristisch verdaut, konnten jedoch nicht den entsprechenden Episomen zugeordnet werden. Auch weitere Analysen mittels PCR und Southern Blot mit genomischer DNA der Klone konnten die stabilen Klone nicht weiter charakterisieren.

Demnach sind Episomen-Klone vorhanden, die unterschiedlich auf T3 reagieren, von denen jedoch nicht bekannt ist, ob die Episomen intakt sind, ins Genom integriert oder methyliert wurden. Folglich wurde für alle weiteren Versuche auf das bereits etablierte, transiente Episomensystem zurückgegriffen.

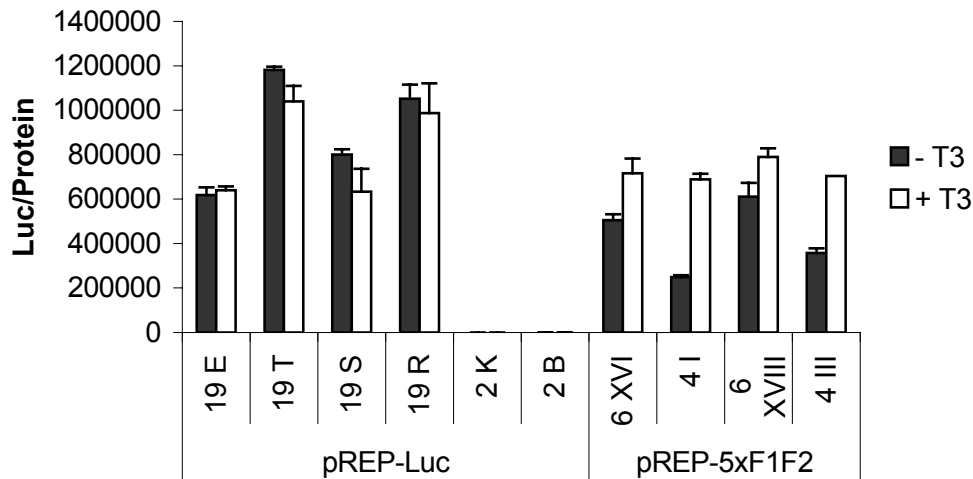


Abb. 4.29: Stabile Episomen-Klone zeigen unterschiedlich Luciferaseaktivität in der An- und Abwesenheit von T3.

N2a-Zellen wurden stabil mit 1 µg Reporterplasmid (pREP-Luc oder pREP-5xF1F2+enh) transfiziert. Nach 3-wöchiger Hygromycin-Selektion (750 µg/ml Medium) wurden Klone isoliert. Diese Klone wurden erneut mit einem Expressionsvektor für TRβ (1 µg) und einem Plasmid mit Neomycin-Resistenzgen (pBK-CMV, 0,2 µg) transfiziert. Nach wiederum 3-wöchiger Selektion mit G418 (375 µg/ml) wurden Klone isoliert. Für die Charakterisierung der Klone wurden sie in Hormon-depletiertem Medium in 6wells ausgesät und für 48 h in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Die Luciferasewerte wurden in Verhältnis zum Gesamtprotein-Gehalt der Proben gesetzt, der durch die Bradford-Methode ermittelt wurde.

4.4.4 CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade ist sensitiv gegenüber HDAC- und Poly(ADP)Ribosylierungs-Inhibitoren

Es ist nachgewiesen worden, dass die CTCF-vermittelte Repressionsfunktion teilweise sensitiv gegenüber dem Histondeacetylasen (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA) ist (Lutz et al., 2000b). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CTCF in der Lage ist, HDAC-Aktivität aus HeLa Zellextrakt zu rekrutieren und *in vitro* mit Sin3A, einem Corepressor mit HDAC-Aktivität, zu interagieren (Lutz et al., 2000b). Daher war es interessant zu untersuchen, ob TSA nicht nur einen Einfluss auf die CTCF-vermittelte Repression, sondern auch auf die Enhancer-Blockade ausübt. Bei Verwendung von TSA in Transfektionsexperimenten mit den F1F2-enthaltenden Episomen, führte dieser Inhibitor zu einer Herabsetzung der Enhancer-Blockade um ca. 80% in hormonunbehandelten Zellen (Abb. 4.30). Dieses Ergebnis legt nahe, dass HDACs nicht nur in die CTCF-vermittelte Repression, sondern auch in die Enhancer-Blockade involviert sind.

Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass die poly(ADP)Ribose (PAR)-Modifizierung von CTCF essentiell für die Vermittlung der Enhancer-Blockade ist (Yu et al., 2004). Um dieses Ergebnis im episomalen System zu bestätigen, wurde der Inhibitor der PAR-Polymerasen

3-Aminobenzamid (3-ABA) für Transfektionsversuche verwendet. Die durch F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade wurde um 30% durch die Verwendung von 3-ABA herabgesetzt (Abb. 4.30), was die bereits bestehenden Daten über die Bedeutung dieser Modifizierung für die Enhancer-Blockade unterstreicht.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sowohl HDACs als auch die Aktivität von PAR-Polymerasen in die durch F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade involviert sind.

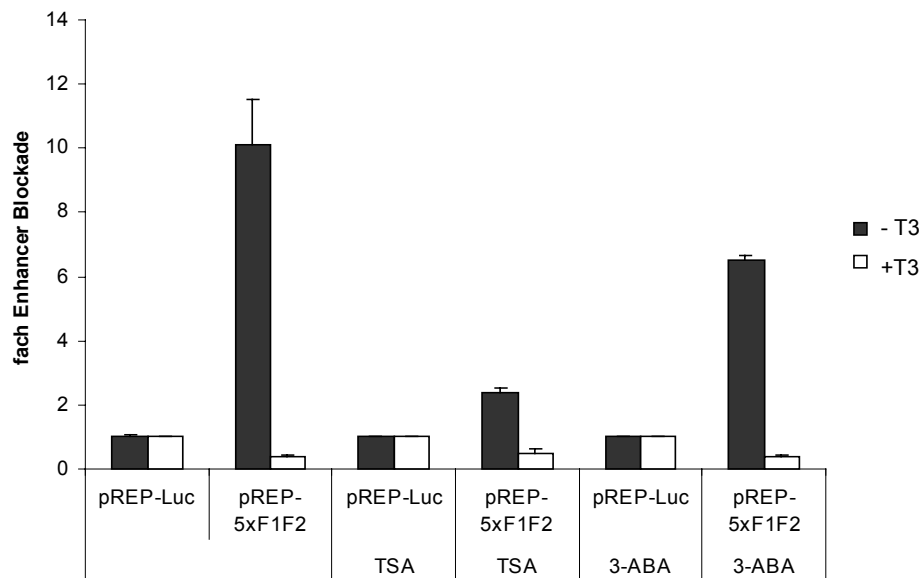


Abb. 4.30: Die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade ist sensitiv gegenüber TSA und 3-ABA.

N2a β -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. Die Zellen wurden 8 h nach Transfektion mit 8 mM 3-ABA oder 100 ng TSA/ml Medium in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 kultiviert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrollexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

4.5 CTCF und TR synergieren in der Enhancer-Blockade

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass CTCF und TR in Repressions- und Aktivierungsmechanismen synergieren, wenn sie auf einer zusammengesetzten Bindestelle agieren (Lutz et al., 2000a). Um den individuellen Einfluss von CTCF und TR auf die durch das zusammengesetzte F1F2-Element vermittelte Enhancer-Blockade zu verstehen, wurden die individuellen Bindestellen mutiert.

4.5.1 Mutation der CTCF-Bindestelle (F1) führt zu einem Verlust der Enhancer-Blockade

Für die Aufhebung der Bindung von CTCF an seine Bindungsstelle, wurden 2 Nukleotide innerhalb der F1-Bindestelle ausgetauscht (Abb. 4.31) und in *Bandshift*-Experimenten hinsichtlich der *in vitro*-Bindung von *E.coli*-exprimierter GST-CTCF Zinkfinger-Domäne (GST-CTCF ZF) untersucht. Die F1 wt-Bindestelle wird von GST-CTCF ZF gebunden. Diese Bindung kann durch einen Überschuss an nicht-radioaktiv markierter F1 wt-Bindestelle, aber nicht durch den gleichen Überschuss an nicht-radioaktiv markierter mutierter F1-Bindestelle kompetiert werden (Abb. 4.31). Die CTCF-Bindung *in vitro* an die mutierte Bindestelle ist demnach drastisch verringert.

CTCF-Bindestelle:

wt 5`AGACACGTAAATACCATAGCTATCCAGTAGAGGTCTCAATTTCTTCA 3`

mut 5`AGACACGTAAATACCATAGCTATCCAGTAGA**AA**TCTCAATTTCTTCA 3`

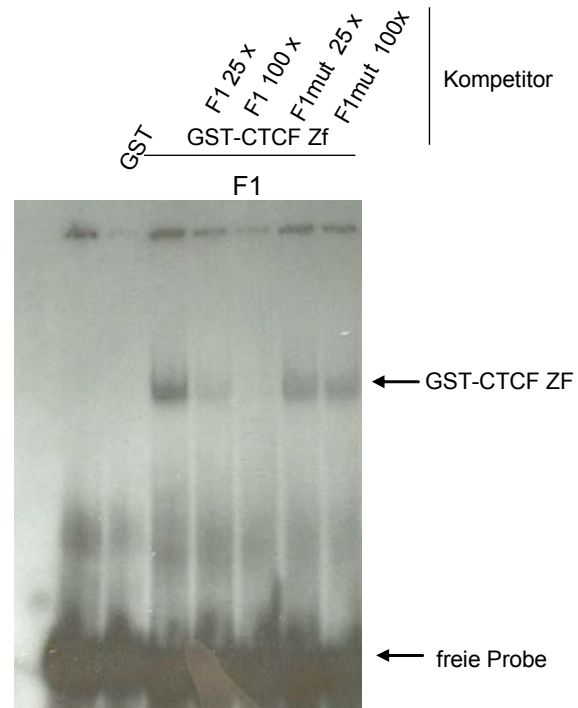


Abb. 4.31: Die CTCF-Bindung an das mutierte F1-Element ist reduziert.

0,5-2 µg *E.coli*-exprimiertes und aufgereinigtes GST oder GST-CTCF ZF wurden zusammen mit 10 ng radioaktiv markiertem Oligonukleotid F1 inkubiert und anschließend auf einem 5%-igen PAA-Gel aufgetragen. Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze zusätzlich mit 25 oder 100fach Überschuss an nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonde (F1 oder F1mut) versetzt. Der Pfeil markiert die Laufhöhe von GST-CTCF ZF.

Die Daten wurden freundlicherweise von Oliver Klaus zur Verfügung gestellt.

Um zu testen, ob dieser Verlust an DNA-Bindung funktionelle Konsequenzen für die Enhancer-Blockade hat, wurden Transfektionsexperimente mit Episomen, die das F1F2- oder F1mutF2-Element integriert haben, durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass im Gegensatz zum wt F1F2-Element, das zu einer 6fachen Enhancer-Blockade führte, die F1mutF2-Bindestelle nicht in der Lage ist, eine signifikante Enhancer-Blockade zu vermitteln (Abb. 4.32).

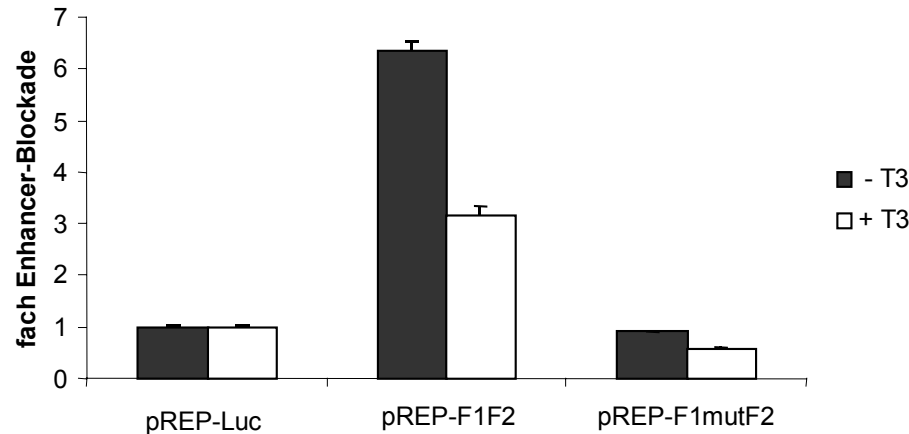


Abb. 4.32: Mutation der CTCF-Bindestelle führt zum Verlust der Enhancer-Blockade.

N2a β -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrollexperimentes (Vektor) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-F1F2 und -F1F2mut ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

4.5.2 Mutation der TR-Bindestelle (F2) führt zu einem Verlust der Enhancer-Blockade

Nachdem die Mutation der CTCF-Bindestelle, die die CTCF-Bindung *in vitro* verhinderte, auch funktionell das erwartete Ergebnis erbrachte, dass nämlich die Enhancer-Blockade nicht mehr nachweisbar ist, sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss der TR auf die Enhancer-Blockade ausübt. Dazu erfolgte auch die Mutation des F2-Elements. Um die Bindung von TR an seine Bindestelle zu unterbinden wurden die beiden Halbseiten der F2-Elements, welches ein invertiertes Palindrom, getrennt durch 6 Nukleotide (IP6), darstellt, mutiert (Abb. 4.33). *Bandshift*-Analysen mit der wt F2-Bindestelle zeigten, dass ein Überschuss an nicht-radioaktiv markierter F2-Bindestelle die Bindung von GST-TR an radioaktiv markierter F2-Probe kompetieren kann. Dagegen kann das mutierte, nicht markierte F2-Element diese Bindung nicht kompetieren, auch nicht unter Einsatz von hochmolarem Überschuss (Abb. 4.33).

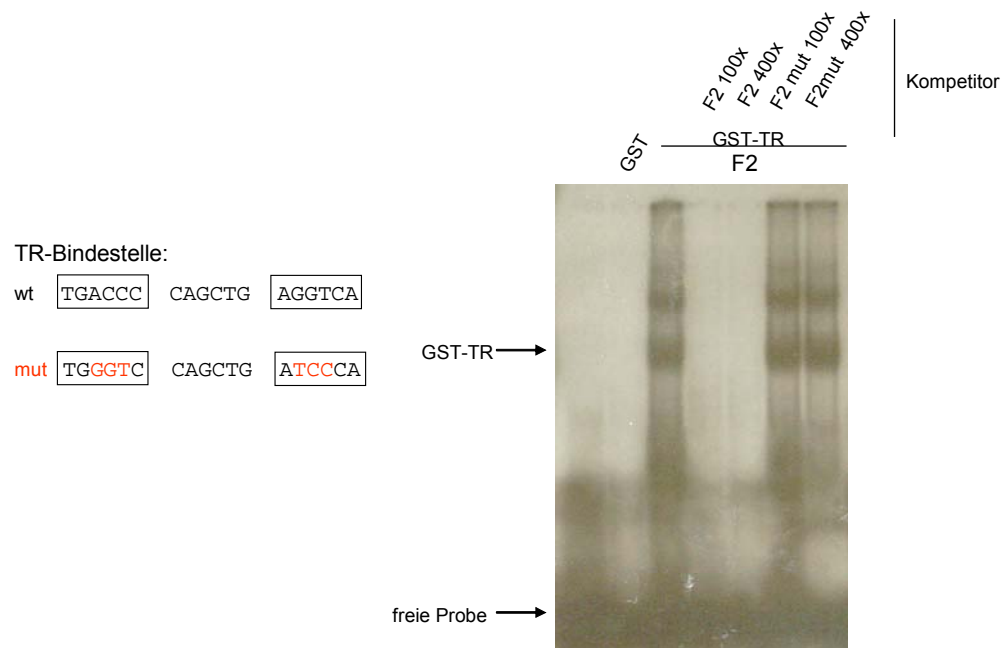


Abb. 4.33: Die TR-Bindung an das mutierte F2-Element ist reduziert.

0,5-2 μ g *E.coli*-exprimiertes und aufgereinigtes GST oder GST-TR wurden zusammen mit 10 ng radioaktiv markiertem Oligonukleotid F2 inkubiert und anschließend auf einem 5%-igen PAA-Gel aufgetragen. Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze zusätzlich mit 100 und 400fach Überschuss an nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonde (F2 oder F2mut) versetzt. Der Pfeil markiert die Laufhöhe von GST-TR.

Die Daten wurden freundlicherweise von Oliver Klaus zur Verfügung gestellt.

Durch die Verwendung eines F2-Elements, das TR nicht mehr binden kann, konnten die funktionellen Konsequenzen der Abwesenheit eines benachbarten TRs für die CTCF-vermittelte Funktion in Ab- und Anwesenheit von Hormon getestet werden. Es wurde erwartet, dass ein Isolator, der aus einer wt F1- und mutierter F2-Bindestelle besteht, Enhancer-Blockade verursachen kann, diese jedoch nicht mehr durch T3 aufgehoben werden kann. Transfektionsexperimente mit den episomalen Reporterkonstrukten, die F1F2wt oder F1F2mut enthielten, zeigten dementsprechend, dass die Mutation der F2 Bindestelle eine T3-Antwort verhindert. Überraschenderweise aber ist hier auch die Vermittlung der Enhancer-Blockade beeinträchtigt, obwohl die CTCF Bindestelle intakt ist (Abb. 4.34).

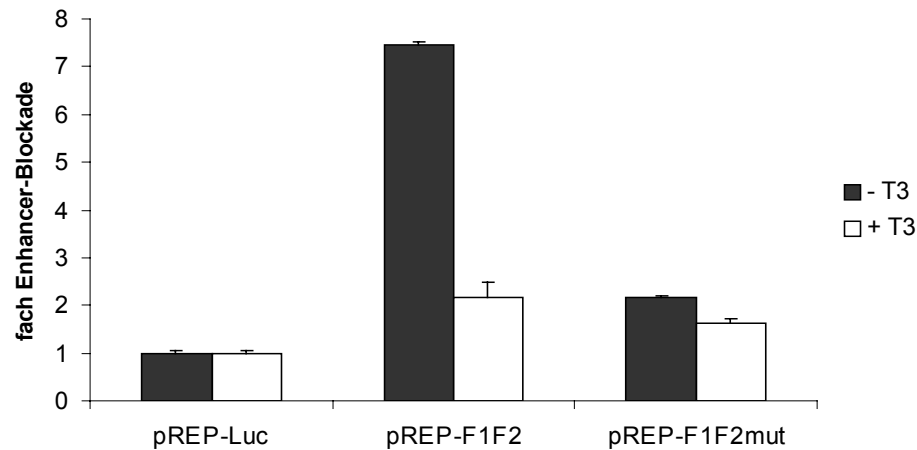


Abb. 4.34: Mutation der TR-Bindestelle führt zum Verlust der Enhancer-Blockade.

N2a β -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrollexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-F1F2 und -F1F2mut ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

Das unerwartete Ergebnis, das zeigte, dass CTCF ohne einen benachbart bindenden TR keine Enhancer-Blockade vermitteln kann, wurde auch mit einem weiteren experimentellen Ansatz analysiert. Dazu wurden F1F2-enhaltende Episomen in N2a-Zellen transfiziert, die kaum TR enthalten. Wiederum wurde beobachtet, dass CTCF allein nicht ausreicht, um die Enhancer-Blockade zu vermitteln, wohingegen die Cotransfektion von TR die Enhancer-Blockade wiederherstellt (Abb. 4.35). Diese beiden unabhängigen Ergebnisse demonstrieren zum ersten Mal ein Beispiel, in dem die Enhancer-Blockade von der Anwesenheit zweier Faktoren, CTCF und TR, abhängig ist. Dagegen ist CTCF alleine nicht in der Lage die Enhancer-Blockade zu vermitteln. Ein benachbart bindender TR in der Abwesenheit von Ligand synergisiert mit CTCF und dieser Synergismus kann durch die Anwesenheit von Ligand aufgehoben werden.

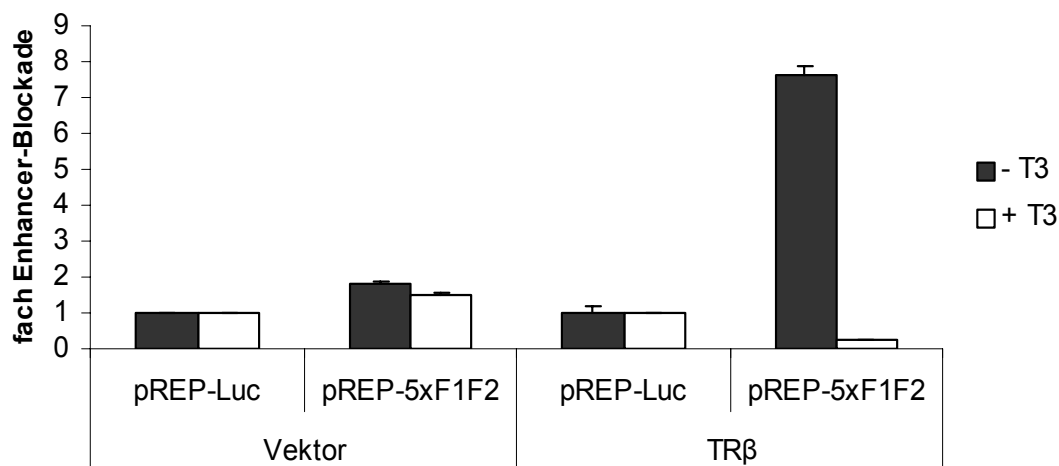


Abb. 4.35: CTCF und TR synergieren in der Enhancer-Blockade.

N2a-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Ein Ansatz wurde zusätzlich mit 0,2 µg TRβ-Expressionsplasmid cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.5.3 Die Bindung von CTCF ist in Anwesenheit von TR erhöht

Ein möglicher Mechanismus für die beschriebene funktionelle Kooperation könnte sein, dass TR die DNA-Bindung von CTCF *in vivo* erleichtert. Dies ist umso wahrscheinlicher, da bekannt ist, dass TR an DNA binden kann, die um Nukleosomen gewickelt ist (Urnov and Wolffe, 2001). Um diese Hypothese zu testen, wurden ChIP-Analysen mit F1F2-Episomen in N2a-Zellen mit und ohne Cotransfektion eines TR-Expressionsvektors und in Ab- oder Anwesenheit von T3 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen tatsächlich einen signifikanten Anstieg in der *in vivo* Bindung von CTCF, wenn TR in den Zellen exprimiert wird. Die Menge an präzipitiertem CTCF auf F1 ist etwa 1% im Vergleich zum Input in TR-defizienten Zellen, während sie in TR-exprimierenden Zellen auf ca. 4% ansteigt (Abb. 4.36). Ein geringer negativer Effekt durch T3 auf die *in vivo* DNA-Bindung von CTCF wurde beobachtet, aber im Vergleich zu den Zellen ohne TR führte der T3-gebundene TR auch zu einem Anstieg in der CTCF-Bindung (nicht abgebildet). Dies ist ein Hinweis, dass TR die Bindung von CTCF auf das zusammengesetzte F1F2-Element erhöht, was zu dem starken synergistischen Effekt, den TR auf die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade ausübt, beitragen könnte. Ein signifikanter T3-Effekt auf die CTCF-Bindung, die durch TR erhöht wird, konnte nicht beobachtet werden und kann somit nicht die Aufhebung der Enhancer-Blockade in der Anwesenheit von T3 erklären. Es stellt sich die Frage, ob andere T3-induzierte

Veränderungen festgestellt werden können, die dazu beitragen, die Aufhebung der Enhancer-Blockade auf dem F1F2-Element zu erklären.

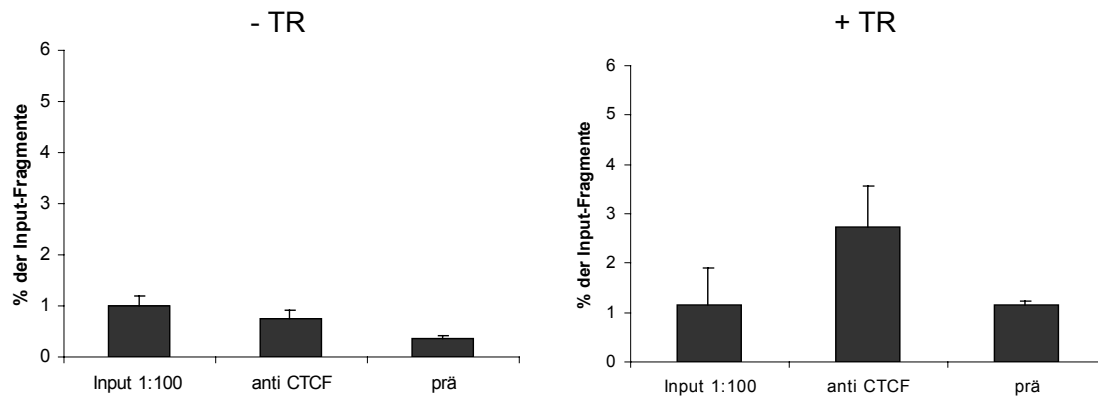


Abb. 4.36: Die CTCF-Bindung ist in der Anwesenheit von TR erhöht.

N2a-Zellen wurden in Maxischalen in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 15 µg episomalem Reporter transfiziert. Ansatz A erfolgte ohne Cotransfektion, während Ansatz B zusätzlich mit 3 µg TR-Expressionsvektor transfiziert wurde. Nach 12 h wurden die Zellen in 2 Schalen aufgeteilt und nochmals für 24 h inkubiert. Der Zellextrakt wurde für die Präzipitation mit 5 µg anti CTCF-Antikörper oder 5 µl Präimmunserum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für das F1F2-Element. Für die Quantifizierung in der Realtime-PCR wurden je 1 µl des verdünnten Inputs (1:100) und der aufgereinigten Präzipitate (anti CTCF, Präimmunserum) verwendet.

4.6 CTCF und TR Interaktion

4.6.1 CTCF interagiert mit verschiedenen Mitgliedern der Kernhormon-Rezeptorfamilie

Eine direkte physische Interaktion zwischen CTCF und TR/RXR wurde bereits beschrieben (Perez-Juste et al., 2000). Allerdings wurde in diesen Studien nicht detailliert auf die Rolle von Hormon eingegangen. Um die Wirkung von Hormon in dieser Interaktion zu verstehen und weitergehend zu untersuchen, ob auch andere Kernhormon-Rezeptoren ebenfalls mit CTCF interagieren können, wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurde GST-CTCF, das an Glutathion-Agarose-Beads immobilisiert wurde, mit verschiedenen ^{35}S -markierten Mitgliedern der Kernhormon-Rezeptorfamilie inkubiert. Alle getesteten Rezeptoren interagieren stark mit CTCF (Abb. 4.37A). Nicht nur die bisher bekannten Interaktionspartner TR β und RXR α , sondern auch die Mitglieder der Steroid-Rezeptorfamilie AR und ER β zeigten im Vergleich zu GST alleine und der *in vitro*-translatierten Negativkontrolle Luciferase eine signifikante Bindung an CTCF.

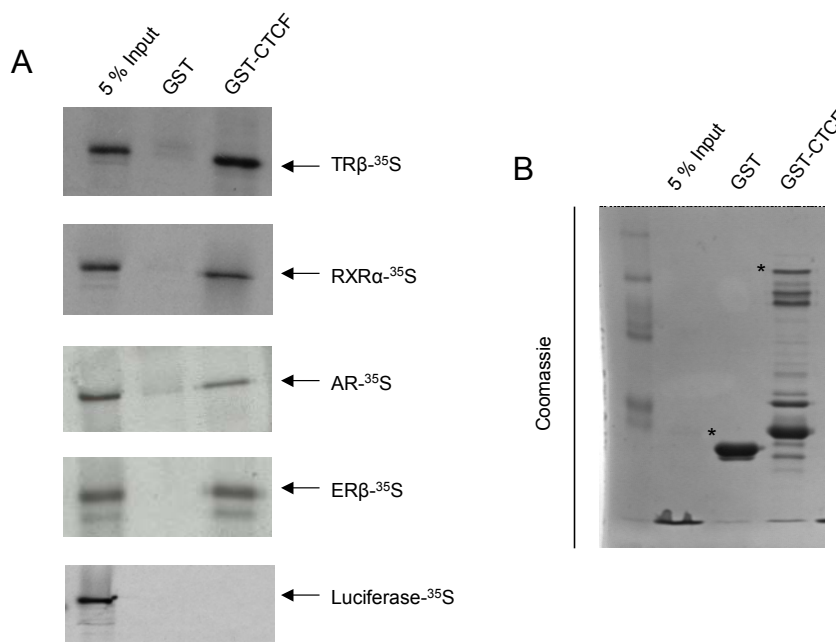


Abb. 4.37: CTCF interagiert *in vitro* mit verschiedenen Mitgliedern der Kernhormon-Rezeptorfamilie.

GST und GST-CTCF wurden zusammen mit *in vitro*-translatiertem, ^{35}S -markiertem TR β , RXR α , AR, ER β und Luciferase inkubiert. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. A) Eine Fluorographie visualisiert das Signal für die verschiedenen Rezeptoren vor (5% Input) und nach der Inkubation. Ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe der Rezeptoren. B) Coomassie-gefärbtes Gel eines GST-Pulldown-Experiments. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine.

4.6.2 Ligand moduliert die CTCF-Rezeptor-Interaktion

Der Ligand von Hormonrezeptoren spielt oftmals eine große Rolle bei Interaktionen zwischen Rezeptoren und anderen Proteinen, wie z.B. Cofaktoren. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Hormon die Interaktion zwischen Rezeptoren und CTCF beeinflusst. Dazu wurden die *in vitro*-translatierten Rezeptoren mit ansteigender Menge an Ligand inkubiert. Die Zugabe von T3 oder 9-cis-RA führte zu einer geringen, aber reproduzierbaren Abnahme der Interaktion zwischen TR/RXR und CTCF. Die Inkubation des *in vitro*-translatierten TR β mit 9-cis-RA, welches kein Ligand für diesen Rezeptor ist, beeinflusste die Bindung an CTCF jedoch nicht (Abb. 4.38). Man könnte anhand dieser Daten spekulieren, dass es sich um zwei Interaktionsdomänen des Rezeptors handelt. Eine, die durch die Bindung des Hormons verloren geht und eine weitere, die hormonunabhängig ist und konstitutiv mit CTCF interagiert.

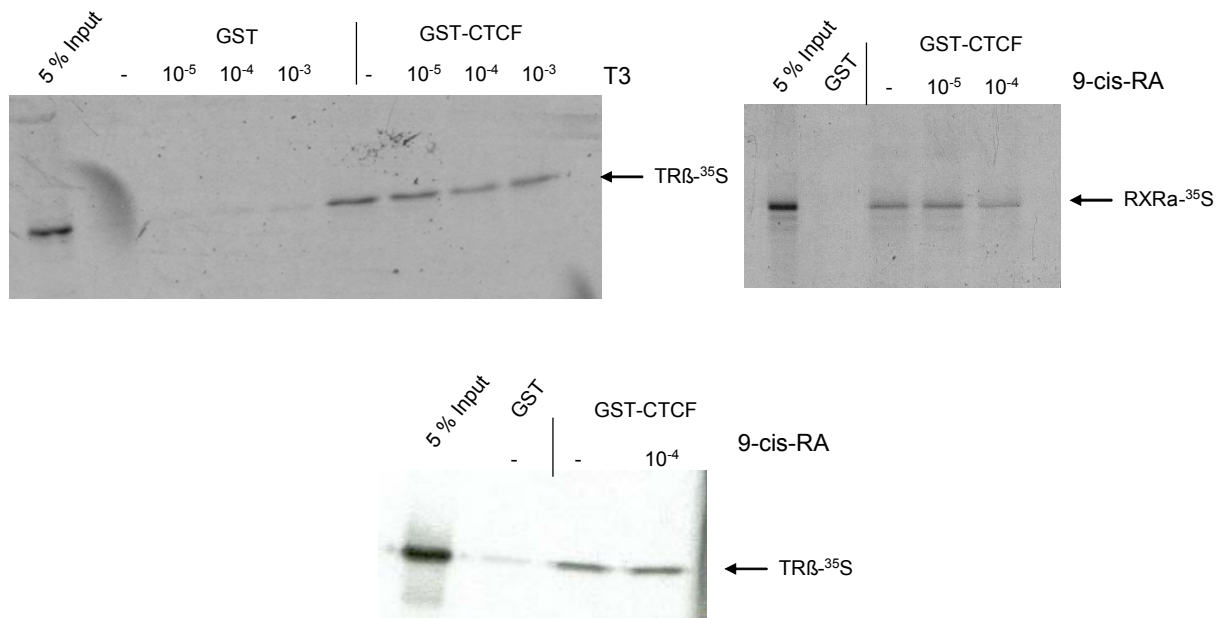


Abb. 4.38: Liganden modulieren die Interaktionen.

Die *in vitro*-translatierten Rezeptoren TR β und RXR α wurden zunächst für 20 min in einer Konzentrationsreihe mit T3 bzw. 9-cis-RA inkubiert. Anschließend wurden GST und GST-CTCF dazugegeben. Nach Inkubation wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert das Signal für die verschiedenen Rezeptoren vor (5% Input) und nach der Inkubation. Die Pfeile verweisen auf die Laufhöhe der Rezeptoren,

4.6.3 Charakterisierung der Rezeptor-Interaktionsdomänen

Das mögliche Vorhandensein zweier Interaktionsdomänen innerhalb der Rezeptoren zieht die Frage nach sich, wo diese beiden Interaktionsdomänen lokalisiert sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden GST-Pulldowns mit GST-fusionierten Rezeptordomänen und ³⁵S-CTCF

durchgeführt. Eine ausreichend starke radioaktive Markierung der Rezeptordomänen war nicht möglich, da innerhalb dieser Proteine zu wenig Methionine vorhanden sind. Die durchgeführten Ergebnisse zeigen, dass die DBD von TR und RXR die hauptsächliche Interaktionsdomäne mit CTCF darstellt (Abb. 4.39). Es wurde bereits beschrieben, dass der N-Terminus des TR für die CTCF-Interaktion von Bedeutung ist, da der TR ohne N-Terminus keine Bindung mehr vermittelt (Perez-Juste et al., 2000). Der N-Terminus des RXR interagiert jedoch nur schwach mit CTCF. Die Liganden-Bindedomäne des RXR zeigte keine Bindekapazität, besonders im Vergleich zur Interaktion mit CTCF mittels der DBD. Im Gegensatz dazu zeigt die TR-LBD eine Affinität zu CTCF, die jedoch geringer ist, als die der TR-DBD. Die Inkubation mit T3 führte hier nicht zu einer wesentlichen Veränderung in der CTCF-Interaktion (Abb. 4.39). Die Hauptinteraktionsdomäne zwischen sowohl RXR als auch TR mit CTCF ist demnach in der DBD enthalten. Jedoch sind innerhalb der verschiedenen Domänen von TR mehrere mögliche wichtige Funktionen für die Enhancer-Blockade kombiniert. Die DNA-Bindungsfunktion ermöglicht eine Bindung von TR neben CTCF auf dem F1F2-Element und schafft eine Oberfläche für die physische Interaktion von beiden Faktoren.

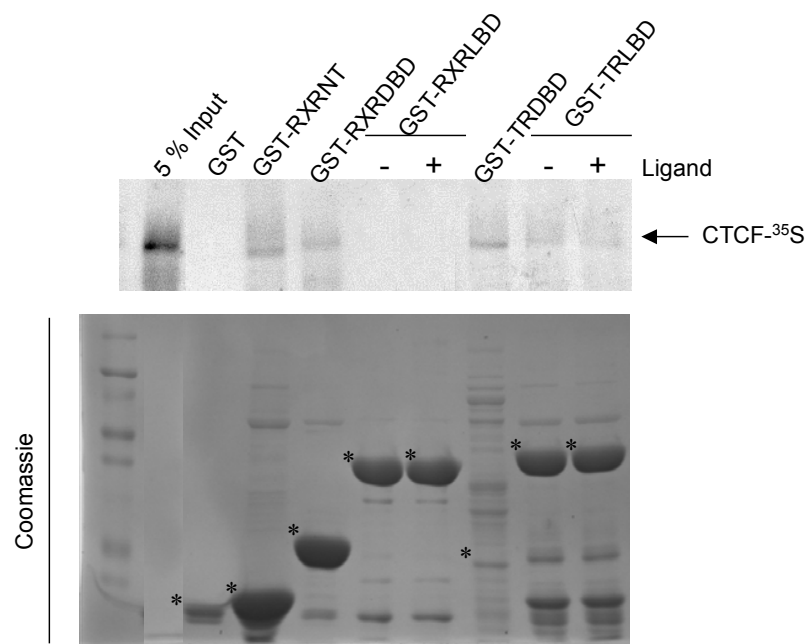


Abb. 4.39: Verschiedene Rezeptordomänen interagieren mit CTCF *in vitro*.

GST und die verschiedenen GST-Rezeptordomänen wurden zusammen mit *in vitro*-translatiertem, ³⁵S-markiertem CTCF inkubiert. Ein zweiter Ansatz mit GST-LBDs wurden zusätzlich mit 10^{-4} M T3 oder 9-cis-RA behandelt. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert das Signal für CTCF vor (5% Input) und nach der Inkubation. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe von CTCF.

4.6.4 Die minimale TR β -Interaktionsdomäne für CTCF dient nur unzureichend der Vermittlung der Enhancer-Blockade

Die DBD des TR besitzt zwei funktionelle und für die Enhancer-Blockade möglicherweise ausreichende Funktionen. Erstens vermittelt sie die Rezeptor-DNA-Bindung und zweitens bildet sie die hauptsächliche Oberfläche zur physischen Interaktion mit CTCF. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Domäne funktionell ausreichend ist, um in der Enhancer-Blockade mit CTCF zu synergieren. Hierfür wurden N2a-Zellen, die kaum endogenen TR enthalten, verwendet, und TR oder TR-DBD überexprimiert. Das Ergebnis dieser funktionellen Analyse zeigte, dass die DNA-Bindedomäne des TR allein nicht ausreicht, um mit CTCF in der Enhancer-Blockade zu synergieren (Abb. 4.40). Dies führt zu der Annahme, dass andere Domänen des TR außerhalb der DBD notwendig sind, um zusammen mit CTCF die Enhancer-Blockade zu vermitteln. Aber das Ergebnis zeigt auch, dass die DBD teilweise zur Enhancer-Blockade beiträgt. Der positive Effekt der DBD auf die durch CTCF vermittelte Enhancer-Blockade könnte daher durch eine kooperative Bindung von CTCF und TR-DBD oder durch die identifizierte Protein-Protein-Interaktionsoberfläche der DBD erklärt werden. Zusätzliche Domänen, vor allem die LBD, könnten benötigt werden, um Cofaktoren zu rekrutieren, die an der Enhancer-Blockade beteiligt sind.

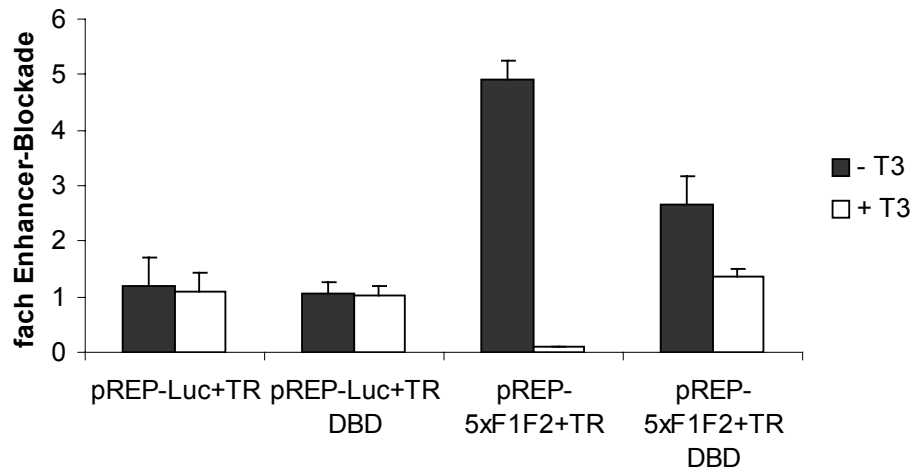


Abb. 4.40: Die minimale TR β -Interaktionsdomäne für CTCF dient nur unzureichend der Vermittlung der Enhancer-Blockade.

N2a-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 μ g episomalem Reporter transfiziert. Die Ansätze wurde zusätzlich mit 0,2 μ g TR- oder TR DBD-Expressionsplasmid cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 μ g) normalisiert.

4.7 CTCF-Deletionsdomänen in der hormonsensitiven Enhancer-Blockade

Die Domänen von CTCF, die für die hormonsensitive Enhancer-Blockade nötig sind, wurden ebenfalls noch nicht lokalisiert. Um individuelle CTCF-Domänen untersuchen zu können, wurde auf ein System zurückgegriffen, mit dem Enhancer-Blockade im transienten Plasmid-Transfer nachgewiesen werden kann (Imke Bardenhagen, Diplomarbeit). Das System basiert auf einer ähnlichen Anordnung von regulatorischen Sequenzen wie das episomale Vektorsystem. Hier befindet sich allerdings statt einer Isolator-Sequenz, wie z.B. F1, die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae*, die sogenannte *upstream activating sequence* (UAS). Auf diesem Weg können Fusionsproteine, die aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 und Teilen von CTCF bestehen, zwischen Enhancer und Promotor binden und deren Effekte studieren werden. So wurde beispielsweise bereits beobachtet, dass sich die Enhancer-Blockade-Domäne im N-Terminus von CTCF befindet. Die AS 2-67 fusioniert an eine DNA-Bindedomäne reichen aus, um die Enhancer-Blockade auf einem Reportergen zu vermitteln (Imke Bardenhagen, Diplomarbeit). Um herauszufinden, welche Domäne von CTCF notwendig ist, nicht nur Enhancer-Blockade auszuüben, sondern auf einem kombinierten CTCF/TR-Element auch die Aufhebung der Enhancer Blockade durch T3 zuzulassen, wurden verschiedene CTCF-Domänen an eine DNA-Bindedomäne fusioniert.

4.7.1 Titration des Gal-UASF2-Systems

Die Analyse der CTCF-Domänen hinsichtlich ihrer Potenz, eine hormonsensitive Enhancer-Blockade zu vermitteln, erfolgte mit Hilfe des bereits beschriebenen Gal-UAS-Systems in transienten Transfektionen. Die CTCF-Domänen wurden an die Gal-DBD fusioniert und zusammen mit einem Plasmid, das das Reportergen Luciferase trug, in NIH3T3-Zellen eingebracht. Zwischen dem Promoter des Luciferasegens und einem SV40-Enhancer wurden verschiedene Kombinationen der Gal-Bindestelle (UAS) und der TR-Bindestelle des Hühner-Lysozyngens (F2) integriert. Zunächst wurde getestet, ob Gal-CTCF in diesem System auf drei verschiedenen Reporterplasmiden (UASF2, (4xUAS)F2, 8xUASF2) die Enhancer-Blockade vermittelt. Hierfür wurden verschiedene Mengen an Effektor (Gal-CTCF) getestet; die Reporteraktivität unter Coexpression von Gal-DBD ohne Fusion wurde gleich eins gesetzt. NIH3T3-Zellen besitzen endogenen TR, der die UASF2-Bindestellen besetzen kann. Deshalb wurde nur der Einfluss von Gal-CTCF untersucht. Unter Verwendung des UASF2-Reporters konnte eine ca. 3fache Enhancer-Blockade ermittelt werden, jedoch keine hormonsensitive Aufhebung (Abb. 4.41). Ein einzelnes UASF2-Element scheint in diesem Kontext zu schwach zu sein. Die transiente Transfektion eines Reporterplasmids, das vier UAS- gefolgt von einer F2-Bindestelle beinhaltete, zeigte einen leichten Anstieg in der

Enhancer-Blockade (ca. 4fach) (Abb. 4.41), was wahrscheinlich auf die Multimerisierung der Gal-Bindestelle zurückzuführen ist, jedoch konnte die Enhancer-Blockade auch hier nicht durch T3 behoben werden. Erst die Verwendung eines Reporters, der eine Multimerisierung der UASF2-Bindestelle besaß, führte zur Vermittlung von hormonsensitiver Enhancer-Blockade, sowohl beim Einsatz von 0,5 als auch von 1 µg Effektor (Abb. 4.41). Die hormonsensitive Enhancer-Blockade, die durch 8xUASF2 vermittelt wurde, ist in ihrer Ausprägung zwar nicht mit der kombinierten Bindestelle F1F2 in Episomen zu vergleichen, konnte aber für die Identifizierung der CTCF-Domänen weiter verwendet werden.

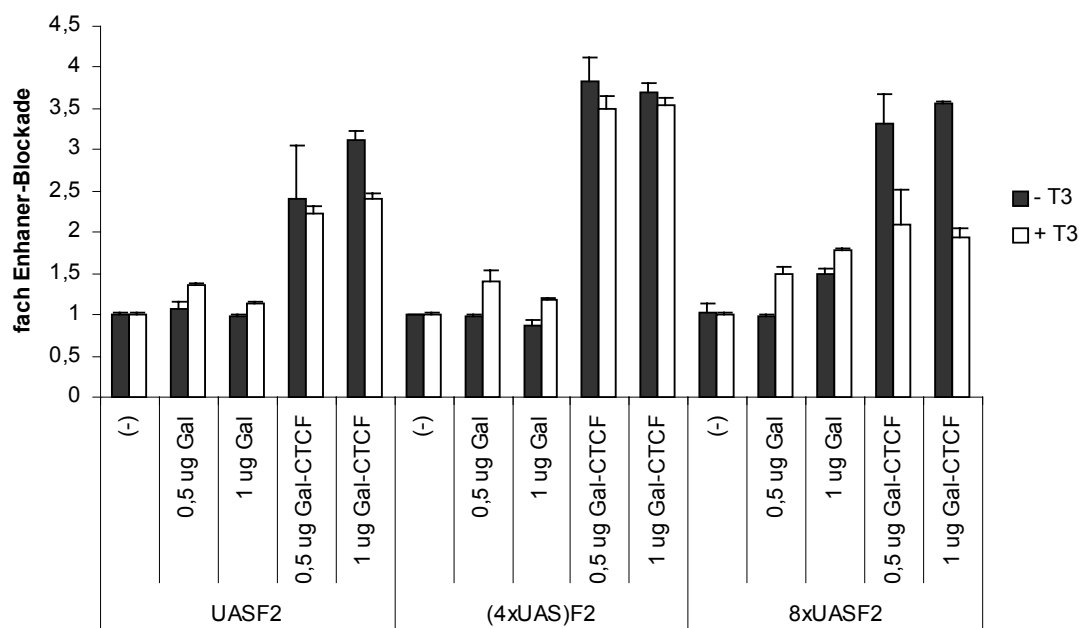


Abb. 4.41: Titration des Gal-UASF2 Systems

NIH3T3-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg Reporter und unterschiedlicher Menge an Effektor transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (-) ohne Effektor in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade durch die verschiedenen Effektoren ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.7.2 CTCF N-Terminus und Zinkfinger vermitteln zusammen die hormonsensitive Enhancer-Blockade

Unter Verwendung des etablierten 8xUASF2-Reportersystems zusammen mit 1 µg Effektorplasmid in NIH3T3-Zellen, wurden verschiedene CTCF-Domänen hinsichtlich der hormonsensitiven Enhancer-Blockade getestet. Gal-CTCF vermittelte eine Enhancer-Blockade, die eine gewisse Beeinflussung durch Hormon zeigte. Die Transfektion der bereits charakterisierten Domäne 2-67 führte zu einer Enhancer-Blockade, die nicht hormonsensitiv ist, während die Zinkfinger-Domäne den Enhancer nicht blockierte (Abb. 4.42). Nur das Gal-

CTCF Fusionsprotein, das die AS 2-577 (N-Terminus + Zinkfinger) beinhaltete, zeigte eine Enhancer-Blockade, die durch T3-Behandlung nahezu aufgehoben wurden (Abb. 4.42). Da sich demnach eine wichtige Domäne innerhalb dieses Bereichs befindet, wurde versucht, diesen weiter einzuschränken. Die Effektorproteine Gal-CTCF NT ZF 1-7 und Gal-CTCF NT ZF1-4 wurden daraufhin kloniert und deren Einfluss auf das Reportersystem getestet. Beide Domänen zeigten jedoch eine Enhancer-Blockade, die nicht hormonsensitiv war (Daten nicht abgebildet). Daraus lässt sich folgern, dass die Domäne, die für die T3-Auswirkung nötig ist, entweder zwischen ZF 7 und 11 liegt oder der wichtige Bereich in den beiden Konstrukten unterbrochen wurde.

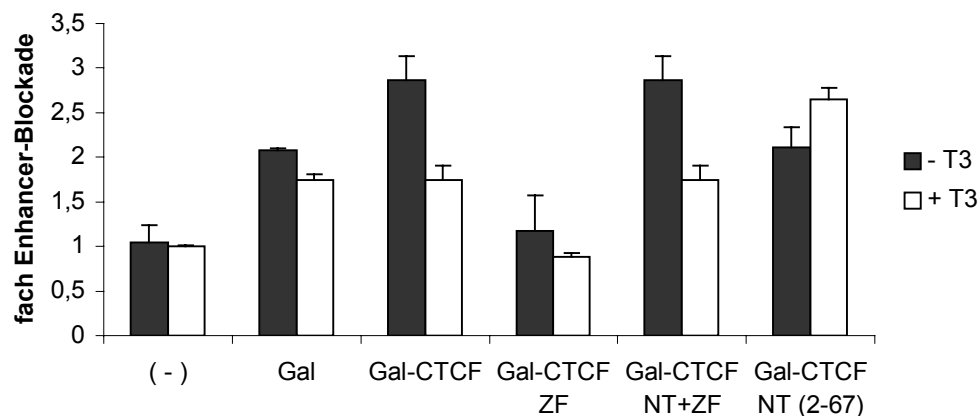


Abb. 4.42: Gal-CTCF N-Terminus und Zinkfinger vermittelt die hormonsensitive Enhancer-Blockade.

NIH3T3-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg 8xUASF2-Reporter und Effektor transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (-) ohne Effektor in der An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade durch die verschiedenen Effektoren ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

Es wurde bereits gezeigt, dass CTCF und TR miteinander interagieren. Um zu untersuchen, ob die CTCF-Domäne, die für die hormonsensitive Enhancer-Blockade von Bedeutung ist, auch ein Interaktionsmotiv für den TR darstellt, wurden GST-Pulldowns durchgeführt. An Glutathion-Agarose-Beads immobilisierte GST-Rezeptoren wurden mit *in vitro*-translatiertem CTCF-NT oder CTCF-ZF inkubiert. RXR und TR zeigten keine Interaktion mit der N-terminalen Domäne von CTCF, wohingegen TR stark von CTCF-ZF gebunden wurde (Abb. 4.43). Die Assoziation von RXR mit den Zinkfingern war deutlich schwächer. Die Inkubation von GST alleine zeigte kein radioaktives Signal. Dies bedeutet, dass der CTCF-NT (AS 2-67), der alleine in der Lage ist, die Enhancer-Blockade zu vermitteln, nicht mit Rezeptoren interagiert. Handelt es sich jedoch um eine hormonsensitive Enhancer-Blockade auf einer kombinierten CTCF/TR-Bindestelle, wird auch die Zinkfinger-Domäne benötigt, die womöglich die Interaktion mit TR vermittelt. Diese Annahme bestärkt die Tatsache, dass die CTCF-Zinkfinger vom Typ C₂H₂ ein potentielles Protein-Protein Interaktionsmotiv darstellen.

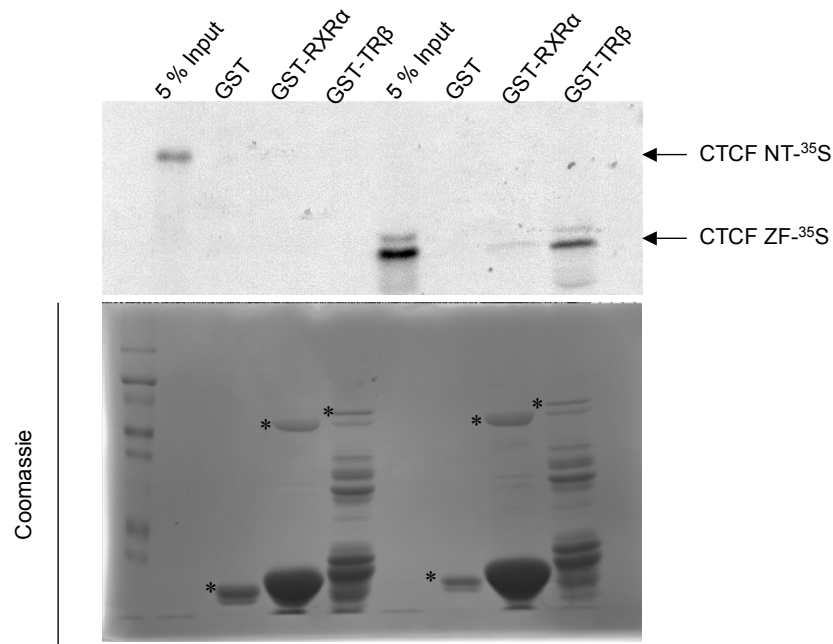


Abb. 4.43: Die CTCF ZF-Domäne stellt ein Interaktionsmotiv für Rezeptoren dar.

GST und die verschiedenen GST-Rezeptoren wurden zusammen mit *in vitro*-translatierten, ^{35}S -markierten CTCF-Domänen inkubiert. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert das Signal für die CTCF-Domänen vor (5% Input) und nach der Inkubation. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe der CTCF-Domänen.

4.8 Die Aufhebung der Enhancer-Blockade durch T3 ist von einer Veränderung des Chromatinstatus begleitet

Transkriptionelle Mechanismen wie Aktivierung oder Repression der Transkriptionsrate gehen in der Regel mit Auflockerung bzw. Verdichtung von Chromatin einher. Diese strukturellen Veränderungen manifestieren sich in Modifikationen an den N-terminalen Armen von Histonen, beschrieben im so genannten Histon-Code (Jenuwein and Allis, 2001). Bislang ist nur wenig über die Änderungen der Histonmodifikationen im Falle der Enhancer-Blockade bekannt. Erste Studien zeigten, dass die T3-Behandlung von Zellen zu einem Anstieg an Histon H4-Acetylierung auf dem Hühner-Lysozymisolator führt (Lutz et al., 2003). Um die Veränderungen des Chromatinstatus, der möglicherweise die Aufhebung der Enhancer-Blockade durch Hormon begleitet, näher zu untersuchen, wurden ChIP-Analysen mit F1F2-Episomen in N2aß-Zellen durchgeführt. Die T3-Behandlung von 1 h führte zu einer Veränderung in der Histonmodifizierung im Vergleich zum Status der Enhancer-Blockade (ohne Hormon). Die Aufhebung der Enhancer-Blockade ist von einem Anstieg der Histon H3K9-Acetylierung und Verminderung der Histon H3K9-Dimethylierung am Isolator charakterisiert (Abb. 4.44A). Somit führt die Hormonbehandlung auf dem F1F2-Element zu einer Zunahme von aktivem, aufgelockertem und Abnahme von inaktivem, verdichtetem Chromatin. Um eine genauere Zeitanalyse hinsichtlich der Histonacetylierung durchzuführen, wurden die mit F1F2-Episomen transfizierten Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit T3 behandelt. Bereits nach 15 min T3-Zugabe war ein Anstieg nicht nur in der Histon H3-, sondern auch in der Histon H4-Acetylierung zu beobachten, die mit zunehmender Behandlung noch weiter zunahm (Abb. 4.44B).

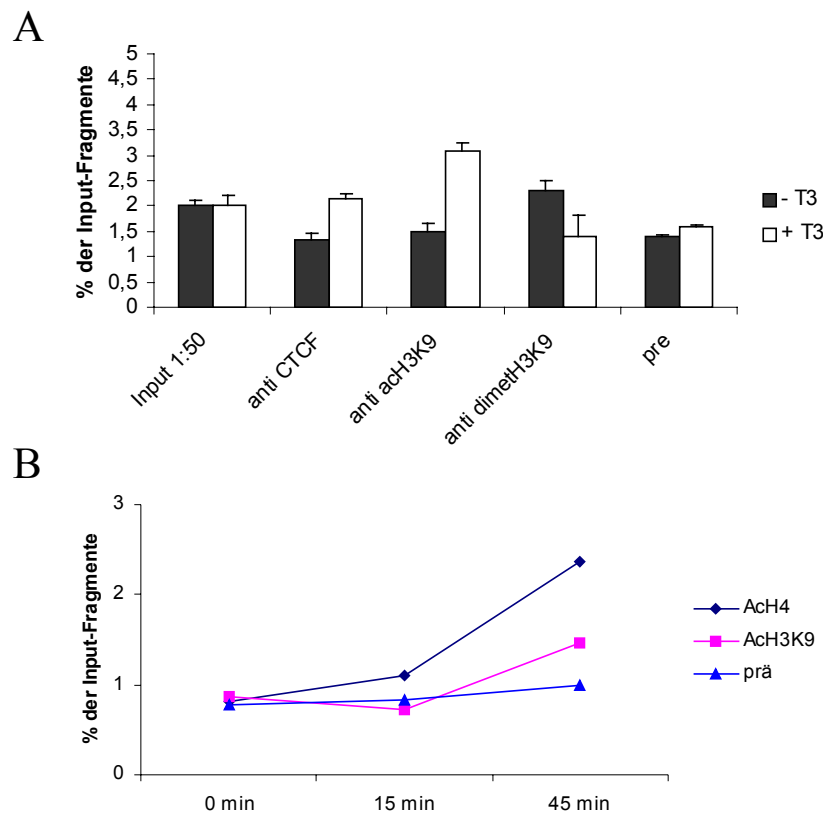


Abb. 4.44: Die Aufhebung der Enhancer-Blockade durch T3 ist durch eine Veränderung des Chromatinstatus gekennzeichnet.

N2a β -Zellen einer Maxischale in Hormon-depletiertem Medium wurden mit 15 μ g pREPF1F2 transfiziert und 12 h nach Mediumwechsel in 2 (A) oder 3 (B) Schalen gesplittet. Nach 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10^{-6} M T3 für verschiedene Zeiträume. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit 5 μ g Antikörper oder 5 μ l Präimmunsereum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für den F1F2-Isolator im episomalen Vektor pREPF1F2. Für die Quantifizierung in der Realtime-PCR wurde je 1 μ l des verdünnten Inputs (1:50) und der aufgereinigten Präzipitate verwendet.

Die beobachtete Änderung von Chromatin in Abhängigkeit von Hormon, benachbart zu einer TR-Bindestelle, ist zu erwarten. Der TR assoziiert in der Anwesenheit von T3 mit Proteinen, die HAT-Aktivität besitzen (zusammengefasst in Rosenfeld and Glass, 2001). In der Abwesenheit von T3 werden HDACs gebunden, deren Wirkung auf Histone eine nachfolgende Methylierung möglich machen (zusammengefasst in Westin et al., 2000). Es stellt sich nun die Frage, was bei einem kombinierten CTCF/TR-Element passiert. Ist CTCF für die beobachteten Änderungen notwendig? Um den Einfluss von CTCF auf die Veränderung des Chromatinstatus, der die Aufhebung der Enhancer-Blockade durch T3 begleitet, zu untersuchen, wurden ebenfalls F1mutF2-Episomen für die ChIP-Analyse verwendet. Für F1mut wurde bereits in *in vitro*-Analysen gezeigt, dass die Bindung von CTCF vermindert ist (siehe 4.5.1). Die ChIP-Analyse zeigte, dass trotz der Verringerung der *in vivo* DNA-Bindung von CTCF um nur 50%, diese dennoch ausreicht, um die Veränderung

von Histonmodifizierungen in der Anwesenheit von Hormon zu inhibieren (Abb. 4.45). Dies bedeutet, dass die beobachtete Änderung des Chromatins nicht allein auf den TR zurückzuführen ist. Auch hier ist ein synergistisches Zusammenwirken von CTCF und TR zu beobachten. Abschließend kann aus den ChIP-Experimenten gefolgert werden, dass die Aufhebung der Enhancer-Blockade von einer Veränderung im Chromatinstatus begleitet ist und CTCF für diesen Einfluss notwendig ist.

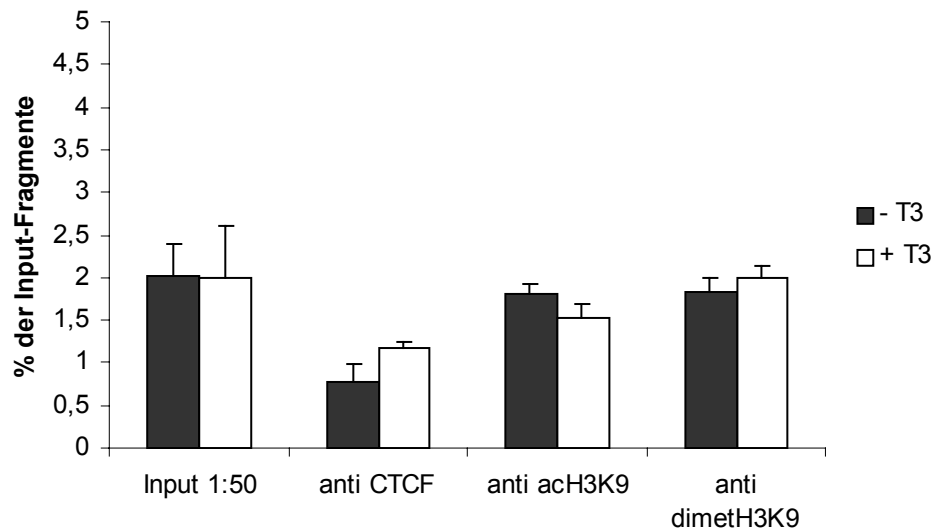


Abb. 4.45: Die Reduktion der CTCF-Bindung führt zu einem Verlust der Chromatinveränderung.

N2aβ-Zellen einer Maxischale in Hormon-depletiertem Medium wurden mit 15 µg pREPF1mutF2 transfiziert und 12 h nach Mediumwechsel auf 2 Schalen gesplittet. Nach 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10^{-6} M T3 für 1 h. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit 5 µg Antikörper inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für den F1F2-Isolator im episomalen Vektor pREPF1mutF2. Für die Quantifizierung in der Realtime-PCR wurde je 1 µl des verdünnten Inputs (1:50) und der aufgereinigten Präzipitate verwendet.

4.9 CTCF-Interaktion mit Histonen als möglicher Mechanismus der hormonsensitiven Enhancer-Blockade

Da sich das umgebende Chromatin der F1F2-Bindestelle nach T3-Zugabe verändert, d.h. dass sich Histonmodifizierungen ändern, ist es denkbar, dass diese Veränderungen einen direkten Einfluss auf die CTCF-Bindung an Chromatin besitzen. Dazu muss zunächst einmal nachgewiesen werden, dass CTCF überhaupt an die Proteinkomponenten von Chromatin binden kann.

4.9.1 CTCF interagiert mit den N-terminalen Enden aller 4 Kernhistone

Aus diesem Grund wurde mittels verschiedener Ansätze untersucht, ob CTCF an Histone bindet. In einem Histonbindungsassay wurde in *E.coli* exprimiertes und an Gluthation-Agarose-Beads immobilisiertes GST-CTCF mit allen vier Kernhistonarmen inkubiert und nach mehreren Waschschritten in einem SDS-Gel aufgetrennt. Durch anschließende Färbung wird eine Assoziation mit Histonen sichtbar (Abb. 4.46A). Es ist deutlich erkennbar, dass CTCF mit Histon H3 und vermutlich auch mit Histon H4 assoziiert ist. Die Bindung ist vergleichbar stark mit der Bindung von GST-Alien und GST-dNAP1 an diese beiden Histone. Für diese beiden Proteine wurde bereits eine Bindung an H3/H4 beschrieben (Maren Eckey, Doktorarbeit). GST allein war nicht mit Histonarmen assoziiert. Da bereits im Input die Auftrennung der vier Histone nicht besonders deutlich war, konnte mit diesem Experiment keine weiteren Aussagen über die Bindung an Histon H2A/B getroffen werden. Um die Bindung von CTCF an Histone zu bestätigen und genauer zu charakterisieren, wurden GST-Pulldown-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde *in vitro*-translatiertes ³⁵S-CTCF mit den GST-gebundenen Histonarmen inkubiert. Dieses Experiment bestätigte die Bindung von CTCF an Histon H3 und H4 und darüber hinaus an Histon H2A und H2B (Abb. 4.46B). GST allein interagiert nicht mit ³⁵S-CTCF. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CTCF in der Lage ist, an Histone zu binden. Damit ist eine Bindung von CTCF an Chromatin nicht nur durch die DNA-Komponente sondern auch durch eine Proteinkomponente möglich. Die Frage ist, ob Modifikationen der Histonarme diese Interaktion von CTCF an Histone ändert.

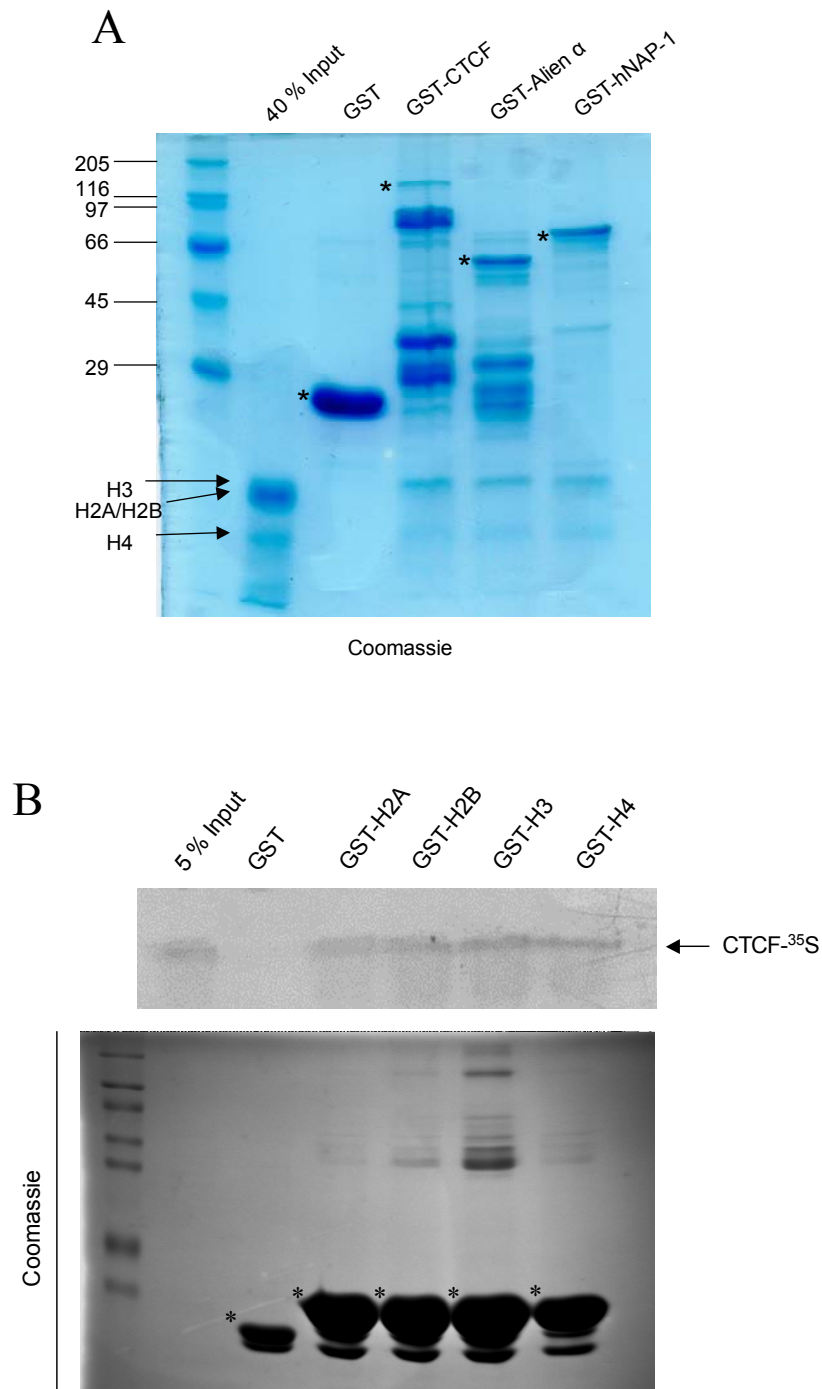


Abb. 4.46: CTCF ist mit Histonen assoziiert.

(A) GST und die verschiedenen GST-Proteine wurden mit Histonen inkubiert und nach mehreren Waschschr ten geleelektrophoretisch aufgetrennt. Das Anfärben mit Coomassie visualisierte die Proteine. Die Laufhöhe der Histone wurde durch Pfeile gekennzeichnet. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine. (B) GST und die verschiedenen GST-Histonarme wurden zusammen mit *in vitro*-translatiertem, ³⁵S-markiertem CTCF inkubiert. Die Proteine wurden anschließend geleelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert das Signal für CTCF vor (5% Input) und nach der Inkubation. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe von CTCF.

4.9.2 Die Acetylierung von Histonarmen durch pCAF oder p300 verändert nicht die Bindung an CTCF

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass CTCF an alle vier Kernhistone bindet. Daher wäre es möglich, dass eine durch T3 induzierte Veränderung der Histone die CTCF-Histon-Bindung inhibiert. Es ist bekannt, dass ein mit T3-besetzter TR Coaktivatoren rekrutiert, die HAT-Aktivität besitzen und so zu einer Acetylierung von Histonen führen. Wenn CTCF an nicht-modifizierte Histone binden kann, könnte eine Modifizierung von Histonen zu einer Aufhebung oder zumindest Veränderung der CTCF-Chromatin-Interaktion führen. Um diesen Aspekt hinsichtlich der Histon-Acetylierung zu untersuchen, wurden die GST-Histonarme vor der Inkubation mit ^{35}S -CTCF einer Acetylierungsreaktion durch die HAT-Enzyme pCAF und p300 unterzogen. Um zu überprüfen, ob die Histonarme effizient durch pCAF und p300 acetyliert werden, wurde zunächst ein Acetylierungsansatz mit radioaktiv markiertem Donor durchgeführt. Hierfür wurden die GST-Histonarme mit pCAF oder p300 in Anwesenheit von ^3H -Acetyl-CoA inkubiert. Die Menge an radioaktiv markierten Histonen in der anschließenden Autoradiographie gab Aufschluss über die Acetylierungseffizienz durch pCAF oder p300. Deutlich erkennbar war, dass die beiden HAT-Enzyme unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen: pCAF und p300 acetylieren alle vier Kernhistone, wobei pCAF Histon H3 und H4 bevorzugt (Abb. 4.47).

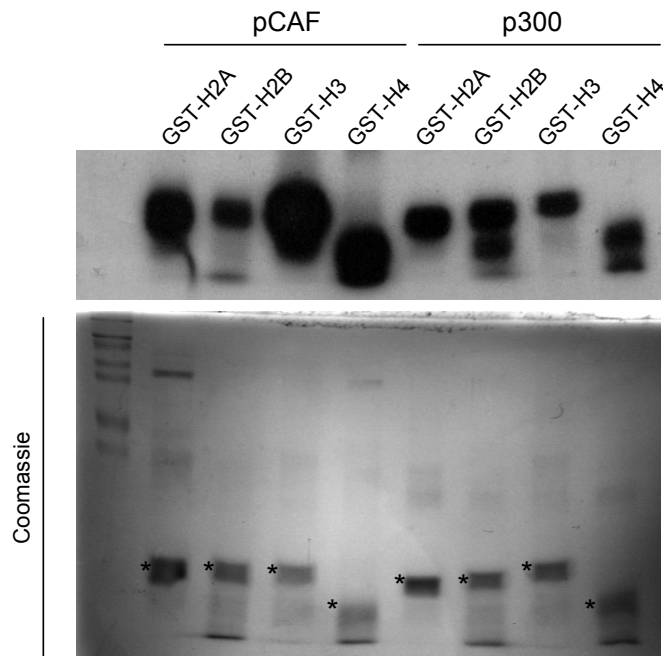


Abb. 4.47: pCAF/p300 acetylieren alle vier GST-Kernhistonarme.

Die verschiedenen GST-Histonarme wurden zusammen mit pCAF/p300 in der Anwesenheit von ^3H -Acetyl-CoA inkubiert. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert acetylierte Proteine. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine.

Um die Bindung von CTCF an die GST-Histone im unmodifizierten Zustand mit Acetylierung direkt zu vergleichen, wurde ein Ansatz mit Histon, Enzym und Substrat und parallel ein Ansatz nur mit Histon und Enzym (ohne Substrat) durchgeführt.

Die GST-Pulldown-Analyse von *in vitro*-translatiertem CTCF mit nicht-modifizierten und acetylierten Histonarmen ergab keinen Unterschied in der Bindung von CTCF an unmodifizierte Histonarmen im Vergleich zu acetylierten (Abb. 4.48). Der Mechanismus der T3-bedingten Aufhebung der Enhancer-Blockade beruht scheinbar nicht auf der Aufhebung der Bindung von CTCF an acetylierte Histone. Jedoch könnten andere Histonmodifizierungen, die durch TR-T3 rekrutierte Coaktivatoren vermittelt werden (z.B. Methylierung), die Ursache hierfür sein.

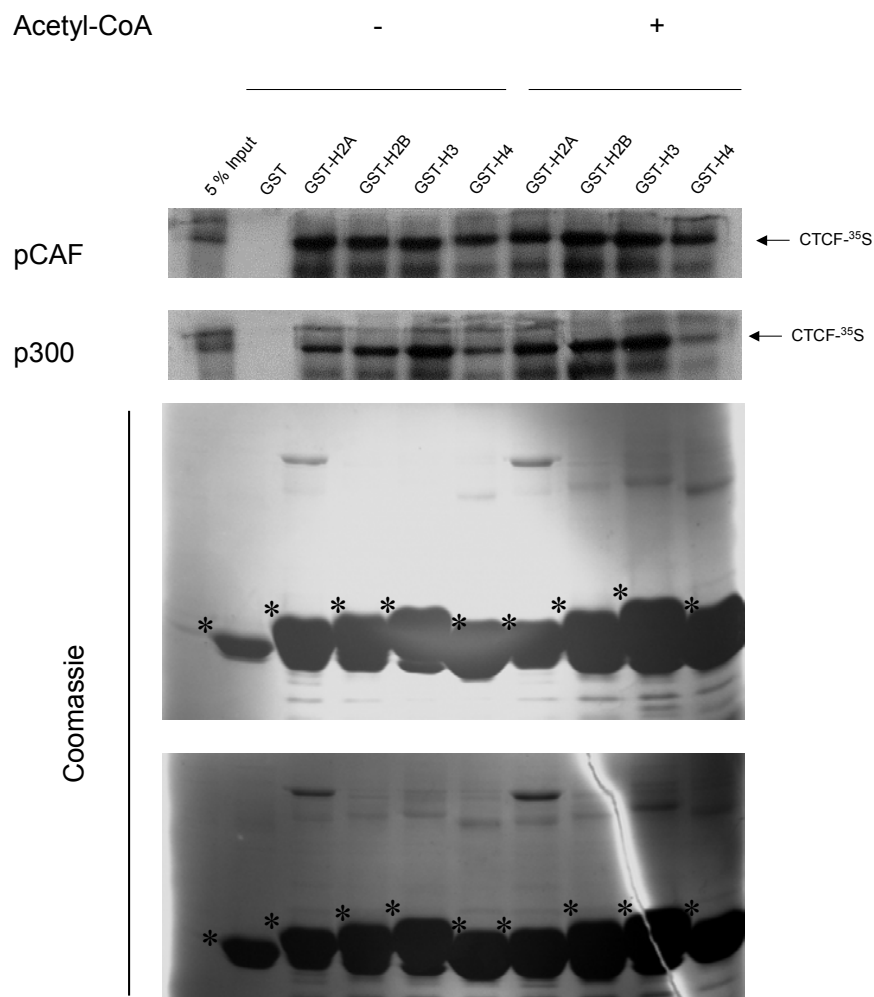


Abb. 4.48: CTCF assoziiert mit Histonen unabhängig von ihrer Acetylierung.

Die verschiedenen GST-Histonarme wurden zusammen mit pCAF/p300 in der An- und Abwesenheit von Acetyl-CoA inkubiert. Anschließend wurde *in vitro*-translatiertes, ³⁵S-markiertes CTCF hinzugefügt. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert das Signal für CTCF vor (5% Input) und nach der Inkubation. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und die Pfeile verweisen auf die Laufhöhe von CTCF.

Parallel wurde zu den Acetylierungs-Bindungsexperimenten die Bedeutung der Acetylierung für die Enhancer-Blockade untersucht. Im bereits etablierten episomalen System der F1F2-vermittelten Enhancer-Blockade wurde der Effekt der Verwendung eines Inhibitors der pCAF/p300-Aktivität (*Anacardic Acid*, AA) untersucht. Überraschenderweise führte die zunehmende Behandlung der mit F1F2-Episomen transfizierten Zellen zu einer verstärkten Abnahme der Enhancer-Blockade (Abb. 4.49). Dies bedeutet, dass die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade die Aktivität der HAT-Aktivität der Enzyme pCAF und p300 benötigt. Da diese Acetyltransferasen sowohl Histone als auch nicht-Histon-Proteine (darunter evtl. auch CTCF) modifizieren, könnte es sich bei dieser Aufhebung der Enhancer-Blockade um indirekte Effekte handeln. Denn es gibt verschiedene Resultate, die belegen, dass die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade HDAC-Aktivität benötigt (siehe Kapitel 4.4.4), die gegensätzlich zur HAT-Aktivität wirkt. Vorstellbar wäre, dass die Aktivität der HAT-Enzyme eine Voraussetzung für die Bindung von CTCF am Isolator ist. Schließlich ist von anderen Isolatoren bekannt, dass sie durch Histonacetylierung gekennzeichnet sind (Zhao and Dean, 2004).

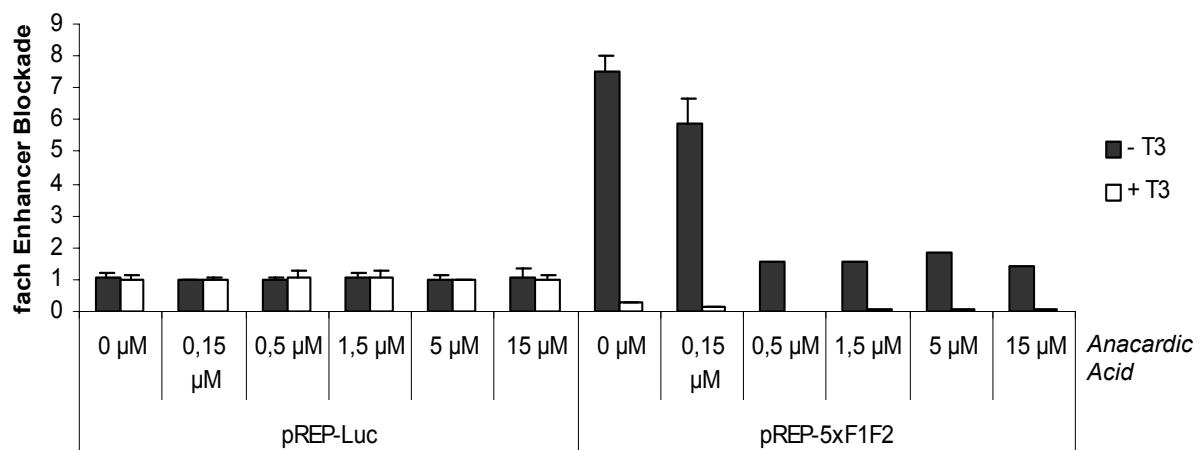


Abb. 4.49: Die Anwesenheit eines pCAF/p300-Inhibitors führt zur Verminderung der Enhancer-Blockade.

N2aβ-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-6} M T3 und unter Verwendung einer Konzentrationsreihe von *Anacardic Acid* wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrollexperiments (pREP-Luc) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade von pREP-5xF1F2 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter β-Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert.

4.9.3 Histonmethylierung als möglicher Mechanismus der Enhancer-Blockade

Um näher zu beleuchten, wie TR/T3 das Chromatin so modifiziert, dass die CTCF-Chromatin-Bindung verändert wird, wurde bereits die Bindung von CTCF an Histone als möglicher Mechanismus untersucht. Die Acetylierung der Histonarme führte zu keiner

Veränderung in der Bindung und kann daher als Mechanismus der hormonsensitiven Enhancer-Blockade ausgeschlossen werden. Ein weiterer Mechanismus der Chromatinmodifizierung ist die Methylierung von Histonen, die üblicherweise zu einer Verdichtung von Chromatin führt. Um zu untersuchen, ob eine andere Histonmodifizierung bzw. Histon-modifizierendes Enzym in der CTCF-vermittelten Funktion eine Rolle spielt, wurde Histonmethyltransferase-Assays durchgeführt. Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob ein Protein mit einer HMT assoziiert ist oder selbst die Funktion einer HMT aufweist. Durch Inkubation von GST, GST-CTCF oder GST-MeCP2 mit HMT-enthaltenden Kernextrakt, Histonen (Substrat) und ^3H -SAM (Donor) sowie einer anschließenden autoradiographischen Auswertung, konnte die Methylierung von Histonen durch Enzyme beurteilt werden. Ohne die Addition von Kernextrakt wurde untersucht, ob die Proteine selbst eine HMT-Funktion aufweisen. MeCP2 assoziierte mit einer HMT, die Histon H3 methylierte, wie bereits von anderen Gruppen beschrieben (Fuks et al., 2003) (Abb. 4.50). Für CTCF jedoch wurden keine methylierten Histone in der An- oder Abwesenheit von Kernextrakt detektiert, da GST-CTCF zu einem gleichstarken Signal führte wie GST allein (Abb. 4.50). Dies lässt den Schluss zu, dass CTCF weder eine HMT ist, noch mit einer HMT assoziiert ist.

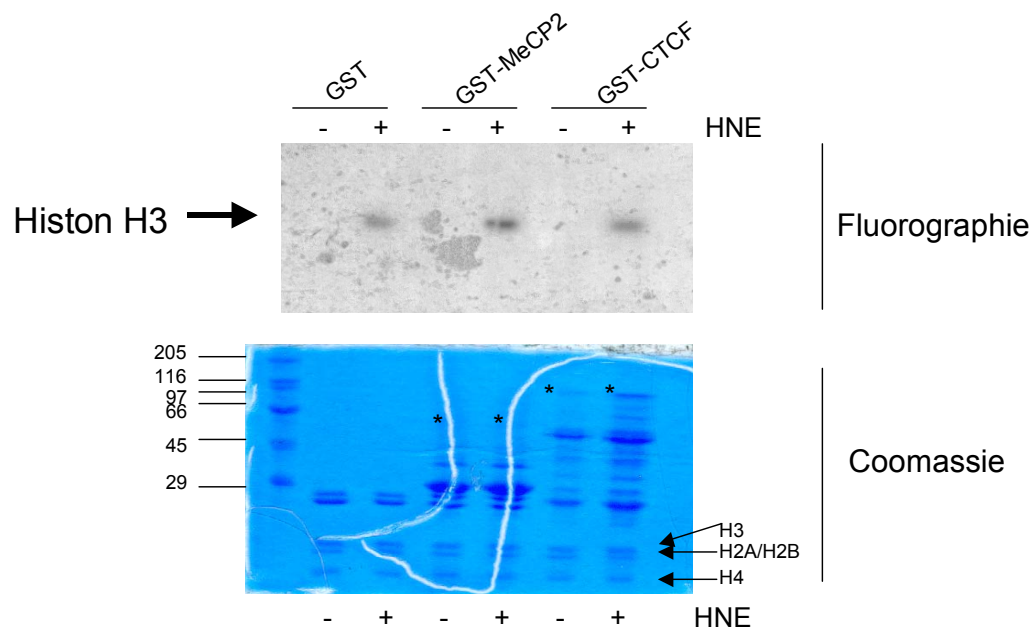


Abb. 4.50: CTCF ist keine HMT und ist nicht mit einer HMT assoziiert.

GST und die verschiedenen GST-Proteine wurden zusammen mit Histonen und ^3H -SAM in der An- und Abwesenheit von Kernextrakt (-, + HNE) inkubiert. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Fluorographie visualisiert das Signal für methylierte Histone. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe der Histone. HNE = *Hela nuclear extract*

4.10 Die Interaktion zwischen RNA Polymerase II und dem Isolator (und DNA-Loop-Formation) findet nur während der Enhancer-Blockade statt

Ein weit verbreitetes Modell für die Enhancer-Blockade beschreibt, dass ein Enhancer Promotoren über lange Distanzen hinweg unter Ausbildung einer Chromatinschleife kontrollieren und aktivieren kann. Ein Isolator, der sich zwischen einem Enhancer und einem Promotor befindet, kann DNA in einem weiteren Chromatinloop ausschließen, und damit den Enhancer blockieren. Um diese Hypothese zu testen, wurden ChIP-Analysen mit F1F2-Episomen durchgeführt. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch für die RNA Polymerase II ist, die ein Bestandteil der basalen Transkriptionsmaschinerie ist und als solcher am Promotor gebunden ist. Um festzustellen, an welche regulatorische Bereiche des F1F2-Episoms die RNA Polymerase II rekrutiert wird, wurden verschiedene Primer für die Amplifizierung von Bereichen des Isolators und des SV40-Promotors gewählt. Es wurde beobachtet, dass während der Enhancer-Blockade (-T3) die RNA Polymerase sowohl im Bereich des Promotors als auch im Bereich des Isolators anzutreffen ist (Abb. 4.51). Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit T3, was zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führt, zu einer Dissoziation der RNA Polymerase II vom Isolator. Währenddessen wird sie dagegen immer noch an den SV40-Promotor rekrutiert (Abb. 4.51). Diese Beobachtungen führen zur Annahme, dass CTCF und TR in der Anwesenheit von Hormon den so genannten Enhanceosom-Komplex auf dem Isolator blockieren. Im Gegensatz dazu könnte die Aufhebung der Enhancer-Blockade von einer Konformationsänderung des CTCF/TR-Komplexes begleitet sein, die dazu führt, dass die basale Transkriptionsmaschinerie nicht länger blockiert werden kann und die RNA Polymerase II das Luciferasegen transkribiert.

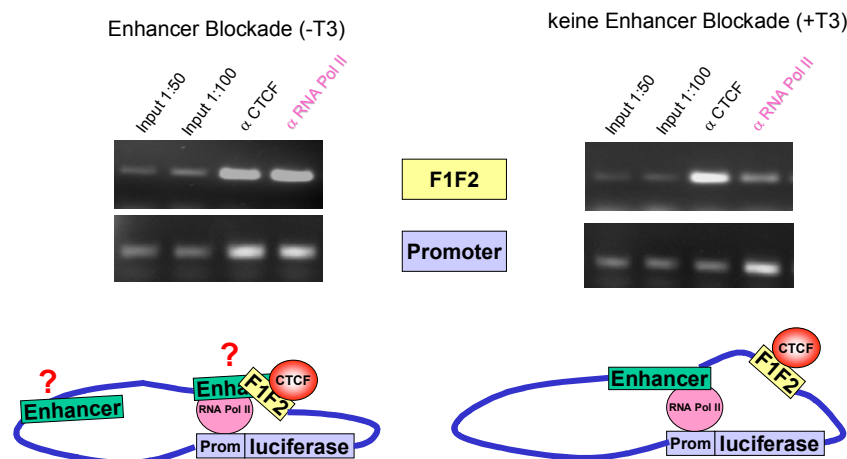


Abb. 4.51: Die Interaktion zwischen RNA Polymerase II und dem Isolator findet nur während der Enhancer-Blockade statt.

N2a β -Zellen einer Maxischale in Hormon-depletiertem Medium wurden mit 15 μ g pREPF1F2 transfiziert und 12 h nach Mediumwechsel auf 2 Schalen gesplittet. Nach 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10^{-6} M T3 für 1 h. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit 5 μ g Antikörper oder 5 μ l Präimmunsereum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für den F1F2-Isolator oder SV40-Promotor im episomalen Vektor pREPF1F2. Für die PCR-Reaktion wurde je 1 μ l des verdünnten Inputs (1:50, 1:100) und der aufgereinigten Präzipitate verwendet.

Aus dem beschriebenen Modell für die hormonregulierte Ausbildung von Chromatinschleifen und Interaktion der RNA Polymerase II, das aus Ergebnissen der ChIP-Analyse gefolgert wurde, geht nicht hervor, wo sich der Enhancer in Abwesenheit von Hormon relativ zu anderen regulatorischen Sequenzen befindet. Um diesen Sachverhalt zu klären, könnten Primer verwendet werden, die einen Bereich des SV40-Enhancers auf dem Episom amplifizieren. Da jedoch der Enhancer nur 70 bp vom Isolator entfernt ist und die für die ChIP-Analyse verwendeten Chromatinfractionen eine Größe von ca. 300-500 bp aufwiesen, könnte nicht zwischen einer Rekrutierung am Isolator oder am Enhancer unterschieden werden. Aus diesem Grund wurden zur Unterscheidung von Isolator und Enhancer Primer ausgewählt, deren Sequenzen sich ca. 50 bp stromaufwärts des Isolators (F1F2 up) und stromabwärts des Enhancers (Enh down) befinden (Abb. 4.52). Diese Bereiche repräsentieren jeweils den Isolator oder Enhancer, sind aber 500 bp voneinander entfernt. Als Kontrolle wurden Primer verwendet, die den β -Aktin-Promotor amplifizieren. Die daraus resultierende Analyse ergab, dass sich die RNA Polymerase II sowohl in der Ab- als auch in der Anwesenheit von Hormon am Enhancer befindet (Abb. 4.52). Dies führt zur Annahme, dass der Isolator in der Abwesenheit von T3 den Enhancer nicht in einer DNA-Schleife isoliert, sondern am Promotor in noch unbekannter Weise inhibiert und dieser somit nicht auf den Promotor wirken kann. Die Präsenz von Hormon verhindert diese Inhibierung und der

Enhancer kann auf den Promotor zugreifen, was die erhöhte Transkription des Gens zur Folge hat.

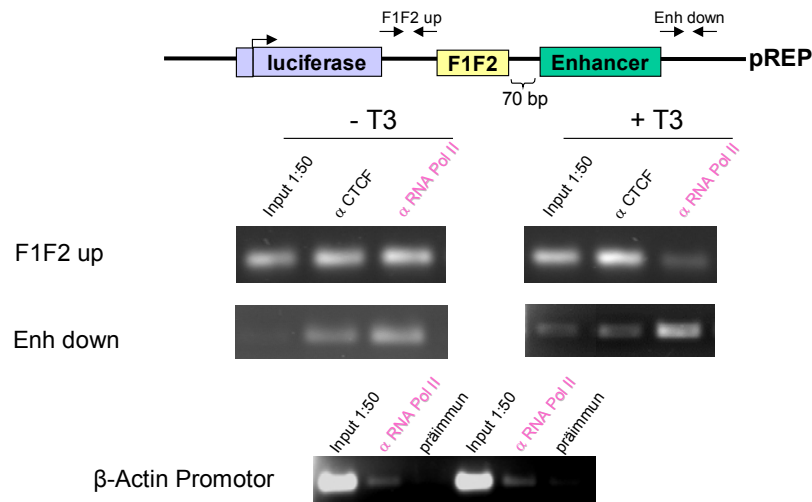


Abb. 4.52: Der Enhancer befindet sich sowohl in der An- als auch in der Abwesenheit von Hormon am Promotor.

N2aβ-Zellen einer Maxischale in Hormon-depletiertem Medium wurden mit 15 µg pREPF1F2 transfiziert und 12 h nach Mediumwechsel auf 2 Schalen gesplittet. Nach 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10^{-6} M T3 für 1 h. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit 5 µg Antikörper oder 5 µl Präimmunserum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern stromaufwärts des F1F2-Isolators oder stromabwärts des SV40-Promotors im episomalen Vektor pREPF1F2. Als Kontrollprimer wurden Oligonukleotide verwendet, die den β-Actin-Promotor amplifizieren. Für die PCR-Reaktion wurde je 1 µl des verdünnten Inputs (1:50, 1:100) und der aufgereinigten Präzipitate verwendet.

Um die hormonell regulierte Rekrutierung der RNA Polymerase II an den F1F2-Isolator zu bestätigen, wurden Hühner-Monozytenzellen (HD11) ebenfalls für die ChIP-Analyse verwendet. Diese HD11-Zellen besitzen einen aktiven Lysozym-Enhancer und den F1F2-Isolator (Position -2,54 kb und -2,38 kb relativ zum Transkriptionsstart) und exprimieren das Lysozymgen (Huber et al., 1995). An diesem endogenen Lysozymlocus konnte ebenfalls eine hormonregulierte Rekrutierung der RNA Polymerase II auf dem Isolator innerhalb seiner natürlichen Umgebung beobachtet werden (Abb. 4.53). Dies Ergebnis bestätigt die Ausbildung von Chromatinschleifen und Interaktion der basalen Transkriptionsmaschinerie mit dem Isolator, die mit der Enhancer-Blockade einhergeht und durch die Anwesenheit von T3 aufgehoben werden kann.

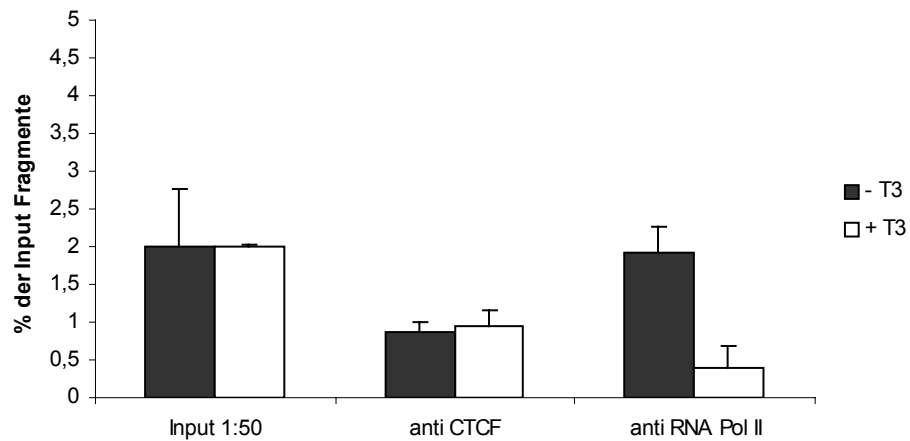


Abb. 4.53: Nur in der Abwesenheit von Hormon assoziieren Promotor und Isolator.

HD11-Zellen einer Maxischale wurden für 1 h mit 10^{-6} M T3 inkubiert oder ohne Hormon kultiviert. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit 5 μ g Antikörper oder 5 μ l Präimmunserum inkubiert. 10% der Chromatinfraction wurde als Input verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für den endogenen Lysozym-Isolator. Für die Quantifizierung in der Realtime-PCR wurde je 1 μ l des verdünnten Inputs (1:50) und der aufgereinigten Präzipitate verwendet.

5 DISKUSSION

CTCF ist ein multivalenter Transkriptionsfaktor, der in eine Reihe von Regulationsvorgängen involviert ist. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen über dessen Fähigkeit, an Isolatoren zu binden und die Wirkung von Enhancern zu blockieren. Im Falle der Positionierung einer CTCF-Bindestellen neben einem TRE handelt es sich nicht um eine konstitutive Enhancer-Blockade, vielmehr kann hier die Blockierung durch Anwesenheit von T3 aufgehoben werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur genaueren Charakterisierung dieser hormonsensitiven Enhancer-Blockade diskutiert.

5.1 Analyse der hormonsensitiven Enhancer-Blockade mittels Episomen

Die meisten Studien der Enhancer-Blockade wurden bisher in stabil transformierten Zellen oder Organismen durchgeführt. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass primäre Effekte der Enhancer-Blockade mittels Plasmiden in transienten Transfektionen getestet werden können (Recillas-Targa et al., 1999). Episomale Vektoren haben gegenüber herkömmlichen Plasmiden den Vorteil, dass sie nicht ins Genom integrieren, aber trotzdem eine normale Chromatinstruktur ausbilden. Es wurde auch gezeigt, dass auf einem Minigen, das in ein Episom integriert wurde, eine ähnliche Nukleosomen-Positionierung wie auf dem endogenen Genlocus vorzufinden ist (Kanduri et al., 2000). Gegenüber stabil integrierten Plasmiden besitzen Episome den Vorteil, dass keine Integration ins Genom erfolgt und somit die Gene nicht den Einflüssen der Integrationsstelle unterworfen werden und auch möglicherweise wichtige genomische Bereiche der Zelle nicht unterbrochen werden können. Zusätzlich können somit verschiedene Konstrukte (z.B. Mutanten) exakt miteinander verglichen werden, da bei stabil integrierten Plasmiden der genomische Kontext von Zellklon zu Zellklon variiert. Die Analyse der Enhancer-Blockade mittels Episomen wurde bereits erfolgreich in *Drosophila melanogaster* durchgeführt (Parnell and Geyer, 2000). Hier konnte gezeigt werden, dass der *Drosophila*-Isolator *gypsy* die Enhancer-Promotor-Kommunikation innerhalb eines Episoms blockieren kann.

Studien über die Enhancer-Blockade mittels Plasmiden in transienten Transfektionen haben sich auch mit der unterschiedlichen Anordnung von Enhancer und Isolatoren befasst. Es konnte gezeigt werden, dass ein Enhancer auf einem zirkulären Plasmid in beide Orientierungen aktiviert, aber die kürzere Reichweite bevorzugt. Also muss ein Isolator, um einen Enhancer zu blockieren, auf einem zirkulären Plasmid nicht zwangsläufig zwischen Enhancer und Promotor plaziert sein. Wird das Plasmid jedoch linearisiert, ist dies wieder Voraussetzung für die Enhancer-Blockade. Die stärkste Enhancer-Blockade wurde beobachtet, wenn der Enhancer mit Isolatoren flankiert wurde. Auch eine Multimerisierung des Isolators führte zu einer erhöhten Enhancer-Blockade (Recillas-Targa et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konstrukte so kloniert, dass der Isolator zwischen Enhancer und Promotor liegt und die Distanz zwischen Enhancer und Reportergen über den Isolator hinweg kürzer ist (ca. 3 kb) als in die andere Richtung (ca. 10 kb) (Abb 5.1). Mit dieser Anordnung wurden auch Reprimierungsaktivitäten durch CTCF auf den Reporterpromoter minimiert. Um dies zu kontrollieren, wurden alle Konstrukte auch ohne Enhancer kloniert. In allen Fällen war die Reprimierung schwächer als der Effekt der Enhancer-Blockade auf das Reportergen (siehe auch Kapitel 4.3.5), so dass der Einfluss durch die Enhancer-Blockade messbar war.

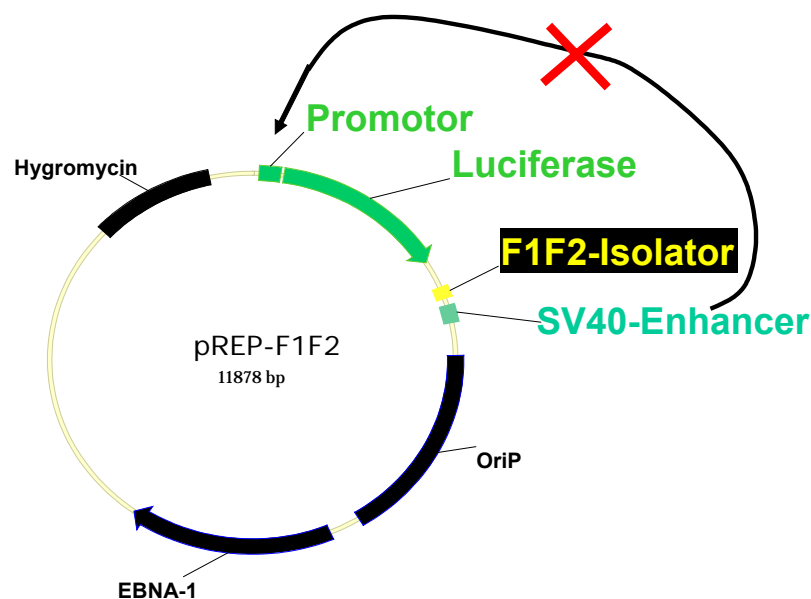


Abb. 5.1: Anordnung der Elemente auf dem F1F2-Episom.

Schematische Darstellung des episomalen F1F2-Plasmids, das eine Größe von 11,9 kb aufweist. Der F1F2-Isolator (gelber Balken) befindet sich zwischen SV40-Enhancer (hellgrüner Balken) und Promotor und Luciferase-Reportergen (dunkelgrüner Balken). In schwarz markiert sind das virale Kernantigen (EBNA-1) und OriP, die zur extrachromosomalen Replikation nötig sind. Zur Selektion in eukaryontischen Zellen diente das Hygromycin-Resistenzgen (schwarzer Balken).

Zunächst wurden kombinierte CTCF/TR-Bindestellen des Hühner-Lysozyms (F1F2) und des humanen c-myc-Gens (N-TR) in die bereits publizierten episomalen Vektoren pREPH19 kloniert. Diese Vektoren sind unter anderem durch ein destabilisiertes GFP-Reportergen gekennzeichnet, das den Vorteil hat, schnell in der Zelle abgebaut zu werden und so die GFP-Akkumulation in der Zelle verhindert. Daher könnten auch rasche Hormoneffekte dokumentiert werden. Nach Etablierung der Transfektion und FACS-Analyse der Vektoren pREPH19-A (ohne CTCF-Bindestelle) und pREPH19-B (vier CTCF-Bindestellen der murinen ICR), wurde versucht, die episomalen GFP-Vektoren mit F1F2- und N-TR-Bindestellen zu charakterisieren. Trotz vielfältiger Versuchsansätze konnte keine eindeutige Auswertung stattfinden. Das Hauptproblem war die Transfektionseffizienz, die sich unterhalb von 2-3%

transfizierter Zellen bewegte und so eine statistisch gesicherte Auswertung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade unmöglich machte. Da der Nachweis des GFP aufgrund geringer Transferrate und relativ ungenauer Nachweismethode kein geeignetes Reportersystem zu sein schien, wurde Luciferase als Reporterprotein ausgewählt. Luciferase lässt sich über mehrere Größenordnungen exakt bestimmen.

Der nächste Schritt bestand daher in der Etablierung eines weiteren episomalen Systems, das auf dem Luciferase-Reportergen beruhte. In einen Zwischenvektor wurden die kombinierten CTCF/TR-Bindestellen des murinen APP β -Promotors und des Hühner-Lysozymgens zwischen SV40-Enhancer und Luciferasepromotor kloniert. Dieser Bereich des Vektors wurde daraufhin in den kommerziellen, episomalen Vektor pREP4 kloniert. Transfektionen der APP-Vektoren ergaben eine Zelltyp-spezifische, jedoch nicht hormonsensitive Enhancer-Blockade. Da jedoch vorherige ChIP-Analysen mit dem APP β -Promotor und Northern Blot-Analysen auf RNA-Ebene den Schluss zuließen, dass es ein funktionelles TRE geben muss, liegt es nahe, dass sich im 200 bp-Fragment, das in den episomalen Vektor kloniert wurde, kein TRE befindet, sondern außerhalb dieses Bereichs. Für die ChIP-Analyse wurden zwar Primer-Paare verwendet, die spezifisch diese 200 bp amplifizierten, da sich aber sonifizierte DNA-Fragmente in der Größenordnung von ca. 500 bp bewegen, können die Hormoneffekte auch durch eine benachbarte DNA-Sequenz hervorgerufen worden sein.

Die Transfektion von F1F2-Episomen jedoch ergab eine signifikante hormonsensitive Enhancer-Blockade. Dieser Effekt ist von CTCF abhängig, da die Intensität der Blockierung auch durch Überexprimierung oder Herunterregulierung von CTCF beeinflusst werden konnte. Dies zeigt, dass ein episomales System etabliert wurde, das zur intensiven Analyse der hormonsensitiven Enhancer-Blockade genutzt werden konnte. Die mit Episomen transfizierten Zellen wurden im Folgenden für die ChIP-Analyse verwendet und es konnte gezeigt werden, dass CTCF an die F1-Bindestelle rekrutiert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit T3-Behandlung eine Histon H4-Acetylierung am Isolator ansteigt, wie es bereits am endogenen F1F2-Element demonstriert wurde (Lutz et al., 2003). Somit konnte ein episomales System mit kombinierter CTCF/TR-Bindestelle etabliert werden, das den endogenen Locus imitiert, aber alle Vorteile eines extrachromosomalen Minigenoms aufweist.

Dies bedeutet, dass im Gegensatz zum so genannten Kolonie-Formierungsexperiment auch mutierte Varianten von CTCF im Vergleich mit wt CTCF in seiner Wirkung getestet werden können. Das Kolonie-Formierungsexperiment ist eine weit verbreitete Methode, um ein DNA-Fragment auf sein Enhancer-Blockade-Potential in Vertebraten-Zellen zu testen (Bell et al, 1999; Bell and Felsenfeld 2000, Filippova et al, 2001; Chao et al, 2002). Hier wird ein Isolator-Element zwischen einem Enhancer und dem Promotor eines Neo^R-Gen platziert und

reduziert durch Blockierung der Genaktivität die Anzahl an G418-resistenten Kolonien. Im Kolonie-Formierungsexperiment, das einer stabilen Integration bedarf und daher bis zur Auswertung ca. 3 Wochen in Anspruch nimmt, ist eine solche Überexpression von CTCF aufgrund der cytotoxischen Auswirkung nicht möglich (Rasko et al., 2001). Darüber hinaus konnten relativ kurzlebige Substanzen wie TSA, 3-ABA und AA auf ihre Wirkung bezüglich der Enhancer-Blockade im episomalen System getestet werden. Auch diese Untersuchungen hätten im Kolonie-Formierungsexperiment keine Aussicht auf Erfolg, zum einen wegen der beschränkten Lebensdauer dieser Substanzen, zum anderen auch aufgrund ihrer weit reichenden Konsequenzen in Bezug auf die Transkriptionsregulation des gesamten Genoms. Eine Unterscheidung von direkten und indirekten Effekten auf die Enhancer-Blockade wäre nach 3 Wochen nicht mehr möglich.

5.2 CTCF und TR synergieren in der Enhancer-Blockade

Es wurde in der Arbeitsgruppe bereits festgestellt, dass CTCF und TR auf den kombinierten Bindestellen des Hühner-Lysozyngens und des humanen c-myc-Gens die Transkription synergistisch aktivieren oder reprimieren können (Lutz et al., 2000a). Um den individuellen Einfluss von CTCF und TR auf die durch F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade zu untersuchen, wurde das etablierte episomale System verwendet. Darüber hinaus wurden für die individuellen Bindestellen funktionelle Mutationen hergestellt, die eine stark reduzierte *in vitro*-Bindung von CTCF oder TR aufwiesen (siehe Kapitel 4.5). Transfektionen mit den mutierten F1F2-Episomen ergaben, dass nicht nur der Verlust der CTCF-Bindung auf F1, sondern auch der Verlust der TR-Bindung auf dem F2-Element eine Enhancer-Blockade verhinderte. Auch in Zellen, die keinen endogenen TR exprimieren, kann von einem wt F1F2-Element keine Enhancer-Blockade ausgehen, womit auf einem anderen Wege die essentielle Bedeutung des TR für die Enhancer-Blockade nachgewiesen wurde. Somit synergieren CTCF und TR auf zusammengesetzten Bindestellen in der Enhancer-Blockade. Es scheint, dass es sich bei dem F1F2-Element um eine Zusammensetzung eher schwacher Bindestellen handelt. Dies wurde gefolgert, da sich bei ChIP-Analysen die Menge an präzipitiertem CTCF auf F1 (ca. 2%) im Vergleich zu bisher publizierten CTS im unteren Bereich bewegt (z.B. myc N-Bindestelle 5%, H19 Locus 4%, β -Globin Isolator FII 2% präzipitierte Input-Fragmente) (Burke et al., 2005). Auch das F2-Element für sich genommen zeigt nur eine schwache Repression auf ein Reportergen (Baniahmad et al, 1987). Erst die Kombination der CTCF- und TR-Bindung in Nachbarschaft führt zu einem starken Element, das als Monomer eine 7fache Enhancer-Blockade und als multimerisiertes Element sogar eine 20fache Enhancer-Blockade vermitteln kann, die fast vollständig von T3 aufgehoben wird. Die Frage ist, warum CTCF nicht auf einem wt F1- neben einem mutierten F2-Element

vermitteln kann, obwohl CTCF auf anderen Bindestellen, wie in der IGF2/H19 ICR oder im β -Globin-Isolator, ohne TR funktionell ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnten posttranslationale Modifikationen von CTCF sein, die durch TR-assoziierte Faktoren vermittelt und durchgeführt werden. Denkbar wären hier z.B. Methylierung, da TR in der Anwesenheit von T3 mit CARM-1, einer Arginin-Methyltransferase, assoziiert ist oder Deacetylierung, da TR in der Abwesenheit von Hormon HDACs rekrutiert. In Frage käme auch eine durch TR vermittelte PARlierung von CTCF. Es wurde bereits gezeigt, dass CTCF zur Ausübung der Enhancer-Blockade diese Modifizierung benötigt (Yu et al., 2004) und Studien ergaben, dass zumindest RXR mit der Polymerase, die PARlierung ausführt, interagiert (Miyamoto et al., 1999). Eine weitere Erklärung für den Synergismus zwischen CTCF und TR könnte die DNA-Bindung selbst sein. Für die ICR des H19/Igf2-Locus wurde gezeigt, dass CTCF in der Linker-Region zwischen zwei Nukleosomen bindet (Kanduri et al., 2002b). Im Falle des Lysozym -2,4 kb-Silencers befindet sich die CTCF-Bindestelle aber innerhalb eines Nukleosoms. Es könnte sein, dass CTCF an dieses Element entweder durch Einsatz anderer Zinkfinger im Vergleich zur ICR an ein Nukleosom binden kann oder aber, dass an einer kombinierten CTCF/TR-Bindestelle TR CTCF in der Bindung an ein Nukleosom unterstützt. Es wurde auch bereits gezeigt, dass TR an DNA, die von Nukleosomen umwickelt ist, binden kann (Urnov and Wolffe, 2001). Diese These wird durch Daten unterstützt, die belegen, dass CTCF ohne die Anwesenheit von TR eine reduzierte Bindung an F1 zeigt (siehe Kapitel 4.5.3).

Somit stellt die Kombination einer CTCF- mit einer TR-Bindestelle eine weitere Möglichkeit dar, die Enhancer-Blockade zu regulieren. Wenn man beachtet, dass es nach Hochrechnungen ca. 10.000 Bindestellen für CTCF im murinen Genom gibt (Yu et al., 2004), ist es durchaus vorstellbar, dass es nicht nur konstitutive, sondern auch regulierbare Enhancer-Blockade gibt. Da die unterschiedliche Methylierung von CTS eine permanente Markierung, z.B. im *Imprinting*, für die Aufhebung der Enhancer-Blockade ist, gibt es durch die An- oder Abwesenheit von TR in Kombination mit der An- oder Abwesenheit von T3 drei Möglichkeiten der regulierbaren Enhancer-Blockade, die in spezifischen Zellen und zu bestimmten Entwicklungsstufen ausgeübt werden könnte.

Auch erweitert diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene synergistische Regulation das Wissen um die Wirkungsweise von Hormonrezeptoren. Der TR ist in der Lage, abhängig von T3 einen durch CTCF isolierten entfernten Enhancer in die Regulation mit einzubeziehen und hauptsächlich dadurch und nicht durch seine eigenen Transkriptionsmechanismen die Transkription zu steigern.

5.3 CTCF- und TR-Interaktion

Es wurde bereits beschrieben, dass CTCF und TR physisch interagieren (Perez-Juste et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die CTCF-Interaktion nicht nur auf den TR beschränkt, sondern auch andere Mitglieder der Kernhormon-Rezeptorfamilie mit einbezieht. Folglich könnte sich die Kombination von CTCF-Bindestellen mit HRE nicht nur auf TR-Bindestellen beschränken, sondern auch andere NHR involvieren. Erste Indizien hierfür gibt es von der ICR des H19/Igf2-Locus. Dort wurde gezeigt, dass alle vier CTCF-Bindestellen von Sequenzen benachbart sind, die Komplexe mit RAR α und ER β binden können (Szabo et al., 2004). Auch wenn die Mutation dieser Sequenzen keine Folge für das *Imprinting*-Muster hatte (Szabo et al., 2006), ist nicht auszuschließen, dass es eine Kooperation zwischen CTCF und weiteren Mitgliedern der Kernhormon-Rezeptorfamilie gibt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ligand (T3 für TR β , 9-cis-RA für RXR α) die Interaktion mit CTCF zwar nicht aufheben, aber doch leicht abschwächen kann. Da es innerhalb der Rezeptoren mehrere Interaktionsmotive für CTCF gibt, wäre es vorstellbar, dass sich die Konformation des CTCF/TR-Komplexes durch Anwesenheit von Hormon verändert, dies wiederum zu veränderter Rekrutierung von Cofaktoren und anschließender unterschiedlicher Chromatinstruktur führt. Die Hauptinteraktionsdomäne stellt die Rezeptor-DNA-Bindedomäne dar. Die Expression dieser Domäne im episomalen System zeigt, dass sie nicht ausreicht, um zusammen mit CTCF hormonsensitive Enhancer-Blockade zu vermitteln. Dies bedeutet, dass die DBD die Interaktion mit CTCF vermittelt, aber andere Bereiche von TR benötigt werden, um die notwendigen Cofaktoren zu rekrutieren, die für die Enhancer-Blockade benötigt werden.

In transienten Transfektionen konnte unter Verwendung eines Gal-UAS-Systems beobachtet werden, dass die N-terminale- und die Zinkfinger-Domäne von CTCF neben TR für die hormonsensitive Enhancer-Blockade benötigt werden (Abb. 5.3). Interessanterweise liegt die TR-Interaktionsdomäne innerhalb von CTCF nicht im N-Terminus, der alleine Enhancer-Blockade vermitteln kann. Vielmehr interagiert CTCF über seine Zinkfinger, die neben dem N-Terminus für die Aufhebung der Enhancer-Blockade benötigt werden, mit TR β und RXR α . Dies ist nicht verwunderlich, da Zinkfinger vom Typ C₂H₂, von denen CTCF zehn Zinkfinger besitzt, ein bekanntes Protein-Protein-Interaktionsmotiv darstellen.

| | | Enhancer-Blockade | Aufhebung der Enhancer-Blockade |
|--|----------|-------------------|---------------------------------|
| | | - T3 | + T3 |
| | | ✓ | ✓ |
| | | ✓ | ✓ |
| | | — | — |
| | | ✓ | — |
| | NT+ZF1-7 | ✓ | — |
| | NT+ZF1-4 | ✓ | — |

Abb. 5.2: Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse mit Gal-CTCF-Domänen und einem 8xUASF2-Reporterkonstrukt.

Schematische Darstellung der Gal-CTCF-Deletionen und deren Effekt auf den 8xUASF2-Reporter. Ein Häkchen bedeutet, dass das Konstrukt Enhancer-Blockade oder Aufhebung der Enhancer-Blockade vermittelt; ein Strich ist ein negatives Ergebnis. Der CTCF-N-Terminus umfasst die AS 1-267 und ist als weißer Balken dargestellt. Die DBD (AS 268-577) ist als schwarzer Balken und der C-Terminus (AS 578-729) als grauer Balken abgebildet. Rot umrandet ist die minimale CTCF-Domäne, die für die hormonsensitive Enhancer-Blockade benötigt wird. NT=N-Terminus, ZF=Zinkfinger

5.4 Involvierung von Cofaktoren und posttranslationale Modifizierungen in der hormonsensitiven Enhancer-Blockade

Es wurde bereits beschrieben, dass CTCF mit HDACs assoziiert ist. CTCF interagiert *in vitro* mit Sin3A und ist in der Lage, HDAC-Aktivität aus Kernextrakt zu rekrutieren, auch wenn keine direkte Interaktion mit HDACs gezeigt werden konnte (Lutz et al., 2000a). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die CTCF-vermittelte Repression sensitiv gegenüber dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) ist. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die Verwendung von TSA im episomalen System auch zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führt. Dies zeigt zum ersten Mal eine Beteiligung von HDACs in der CTCF/TR-vermittelten Enhancer-Blockade. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass die posttranslationale Modifizierung von CTCF durch die PAR-Polymerase für die Vermittlung der Enhancer-Blockade eine Rolle spielt. Zwar wurde die Blockierung nicht völlig aufgehoben, wie es zuvor gezeigt wurde (Yu et al., 2004), jedoch erfolgte eine signifikante Reduzierung um 30% (siehe Kapitel 3.4.4). Der Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich um eine kombinierte CTCF/TR-Bindestelle handelt.

Die Assoziation mit der PAR-Polymerase PARP1 wurde zumindest für RXR beschrieben (Miyamoto et al., 1999). Vorstellbar wäre, dass dieses Enzym auch vom TR/RXR-Heterodimer rekrutiert wird und zur Modifizierung von CTCF führt.

Insgesamt bleibt die Frage, ob die Rekrutierung von HDACs, PARlierung und anderer Faktoren über CTCF erfolgt, oder aber, ob die Faktoren hierfür erst über TR rekrutiert werden. Im Allgemeinen ist bekannt, dass die Transkriptionsaktivität von DNA-gebundenem TR über Cofaktoren vermittelt wird, die in einer Liganden-sensitiven Weise rekrutiert wurden. Diese Cofaktoren können in Coaktivatoren, die Genaktivierung vermitteln, und Corepressoren, die zur Genreprimierung führen, unterteilt werden. Zahlreiche Corepressoren, die direkt an die LBD des TR binden, wurden charakterisiert, einschließlich SMRT/N-CoR, Alien, Cyclin-D1 und SUN-CoR (zusammengefasst in Rosenfeld and Glass, 2001). Die SMRT/N-CoR Corepressoren kommen einerseits innerhalb anderer Komplexe vor, die HDACs zum DNA-gebundenen Rezeptor rekrutieren, und können andererseits selbst HDACs binden. Diese Chromatin-modifizierenden Enzyme deacetylieren die Lysinreste der Histonarme, was zu einer Kondensierung der Chromatinstruktur führt, die dadurch weniger zugänglich für Transkriptionsfaktoren wird.

Die Bindung von Ligand hat zur Folge, dass die TR-Konformation so verändert wird, dass die Corepressor-Komplexe dissoziieren und Coaktivatoren rekrutiert werden. Diese Coaktivatoren schließen p160-Proteine ein, die wiederum p300/CBP rekrutieren, Proteine, die eine Histon-Acetyltransferase(HAT)-Aktivität aufweisen. Der T3-besetzte TR führt auch zur Assoziation mit pCAF/GCN5-Komplexen, die ebenfalls HAT-Aktivität innehaben. Diese Enzymaktivität agiert gegensätzlich zur HDAC-Aktivität und resultiert in einer offenen Chromatinstruktur (zusammengefasst in Westin et al., 2000).

Die Nähe einer CTCF-Bindestelle zu einem TRE wirft die Frage auf, ob sich die Faktoren und Cofaktoren, die jeweils rekrutiert werden, gegenseitig beeinflussen, was zu einer Stabilisierung eines höheren Komplexes führen könnte. Es wurde gezeigt, dass CTCF die TR-Anwesenheit benötigt und beide Faktoren miteinander interagieren, was bedeuten könnte, dass die Interaktion vor der DNA-Bindung statt findet. Da TR eine Reihe von Cofaktoren rekrutiert, wäre es vorstellbar, dass diese Proteine auch in die Regulierung der CTCF-Aktion durch TR involviert sind. Denkbar wäre eine Beteiligung von Sin3A-Komplexen, denn sowohl CTCF als auch TR sind mit Sin3A-Komplexen assoziiert. Der Komplex von DNA-gebundenem TR/RXR und CTCF könnte eine Plattform für den Sin3A-Komplex bilden, der dann durch die Interaktion von CTCF und TR stabilisiert wird.

Die Anwesenheit von Ligand hat dann die Rekrutierung der HAT-Komplexe zur Folge, was z.B. zur Acetylierung von CTCF und somit zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führen könnte (Abb. 5.3). Dieser dynamische und zeitlich sehr schnell ablaufende Wechsel von assoziierten Komplexen mit antagonistischen enzymatischer Funktion am F1F2-Element ist

möglicherweise die Schlüsselreaktion, die Enhancer-Blockade, als auch das Abstellen der Enhancer-Blockade durch T3 möglich macht. Ob die enzymatischen Funktionen nur auf das Chromatin wirkt oder auch die beteiligten DNA-bindenden Elemente, Aktivatoren, CTCF, TR und Promotor-assoziierte Faktoren verändern, muss in Zukunft analysiert werden.

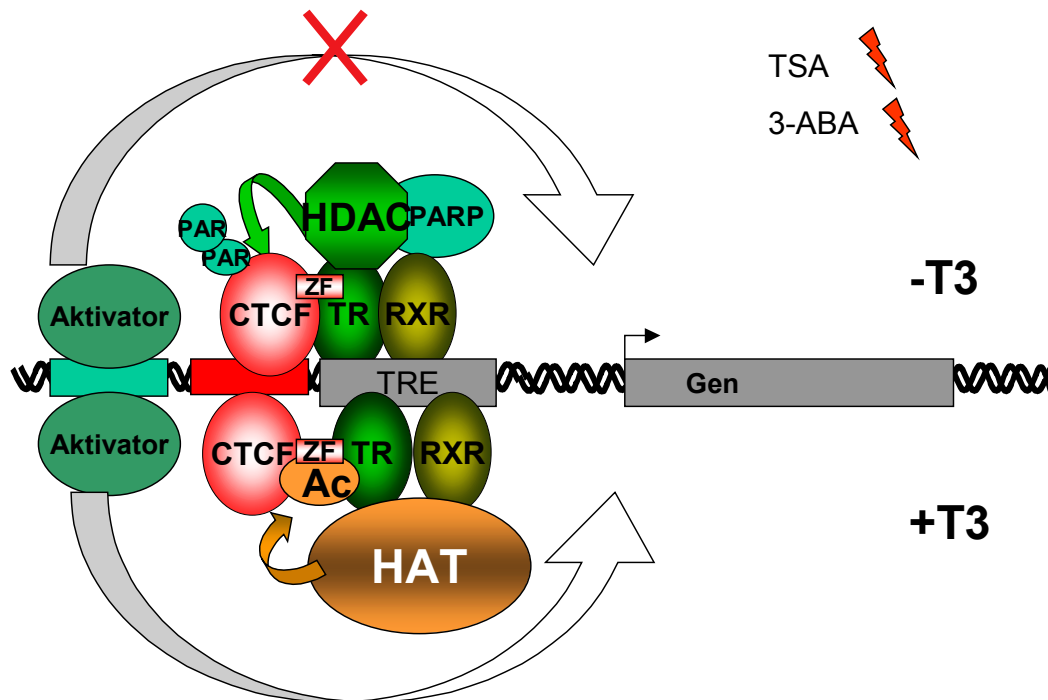


Abb. 5.3: Modell für den Einfluss der TR-Cofaktoren auf die CTCF/TR-vermittelte Enhancer-Blockade.

Die Rekrutierung von HDAC-Aktivität auf das F1F2-Element in Abwesenheit von Hormon. Mögliche Assoziation von PARP1 könnte zur PARylierung von CTCF führen. Blitze verbildlichen die Ergebnisse, die zeigten, dass die Verwendung von HDAC-Inhibitor (TSA) und Inhibitor für PARylierung (3-ABA) zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führt. In Anwesenheit von T3 werden Cofaktoren mit HAT-Aktivität rekrutiert, was möglicherweise zur Acetylierung von CTCF und zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führen könnte.

5.5 Hormon reguliert die Rekrutierung des Isolators an den Promotor

Um die F1F2-vermittelte Enhancer-Blockade, die auf dem Synergismus zwischen CTCF und TR beruht, näher zu beleuchten, wurden ChIP-Analysen mit dem etablierten Minichromosom-System durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufhebung der Enhancer-Blockade mit einer Zunahme an aktivem (H3K9-Acetylierung) und einer Abnahme an reprimierendem Chromatin (H3K9-Dimethylierung) einhergeht (siehe Kapitel 4.7). Dieser „Switch“ der Histonmodifizierung könnte folglich die Ursache der T3-Bindung an TR sein. Jedoch spielt dabei die CTCF-Bindung an F1 eine entscheidende Rolle, da die Mutation von F1 ausreicht, um nicht nur die Enhancer-Blockade aufzuheben, sondern auch die mit der Aufhebung der Enhancer-Blockade verbundenen Histonmodifizierungen.

Um den Mechanismus der hormonsensitiven Enhancer-Blockade detaillierter zu analysieren, wurden weitere ChIP-Analysen mit F1F2-Episomen durchgeführt. Unter Verwendung eines RNA-Polymerase II-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass im Zustand der Enhancer-Blockade sowohl CTCF als auch RNA Polymerase II auf dem F1F2-Isolator rekrutiert wird. Anders gesagt, befindet sich damit auch CTCF am Promotor. Dies bedeutet, dass Isolator- und Promotor-bindende Faktoren miteinander assoziieren. Die Akkumulation von RNA Polymerase II am Isolator durch die Enhancer-Blockade wurde bereits für den Hühner- β -Globin 5'HS4-Isolator beschrieben. Da es dort gleichzeitig zu einer verminderten Rekrutierung der RNA Polymerase II am Promotor des β -Globin-Gens kam, wurde gefolgert, dass im Falle der Enhancer-Blockade der Transfer der RNA Polymerase II vom Enhancer zum Promotor durch einen Isolator aufgehalten wird (Zhao and Dean, 2004). Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass Enhancer über wandernde Signale z.B. in Form von Histonmodifizierungen entlang des DNA-Strangs wirken. Die Verwendung spezifischer Primer für Enhancer und Promotor der F1F2-enthaltenden Episomen in der vorliegenden Arbeit führten jedoch zum Resultat, dass die Enhancer-Blockade von einer Rekrutierung sowohl von CTCF als auch RNA Polymerase II am Promotor und Enhancer begleitet ist. Dieser Befund spricht sich gegen das sogenannte Tracking-Modell aus und führt zur Annahme einer Chromatinschleifen-Ausbildung, das sogenannte Loop-Modell (Gerasimova et al, 2000).

Generell ist bekannt, dass Enhancer *Chromatin-Remodelling*-Komplexe und RNA Polymerase II durch die Wirkung von sequenzspezifischen DNA-Bindefaktoren rekrutieren (Farrell et al, 1996; Ptashne et al, 1997). Da die Enhancer-Wirkung jedoch noch nicht genau bekannt ist, wurden einige Modelle aufgeführt, die den Transfermechanismus der Aktivierungskomponenten vom Enhancer zum Promotor erklären könnten. Konform mit dem Chromatinschleifen- oder direktem Kontakt-Modell, wurden RNA Polymerase II und Histon-Acetylierung am Enhancer und Promotor des Gens für das Prostata-spezifische Antigen (PSA), aber nicht in der dazwischen liegenden Region, detektiert (Shang et al., 2002). Jedoch unterstützen andere Ergebnisse von diesem Genlocus das Tracking-Modell. Es wurde gezeigt, dass RNA Polymerase II am PSA-Enhancer unabhängig von der Promotor-Rekrutierung detektiert werden kann und zusammen mit Histon-Acetylierung zwischen Enhancer und Promotor anzutreffen ist (Louie et al., 2003). Dies sind nur zwei von vielen Beispielen, die das eine oder andere Modell unterstützen, ein eindeutiger Hinweis für die Richtigkeit eines der beiden Modelle gibt es aber nicht. Es wäre auch vorstellbar, dass beide Modelle zutreffen.

Die Tatsache, dass CTCF und RNA Polymerase II sowohl am Promotor und Enhancer als auch am Isolator der F1F2-Episomen präzipitiert werden konnten, könnte für ein störendes Eingreifen der Isolator-Proteine auf das sog. Enhanceosom (Enhancer- und Promotor-

Proteine) sprechen (Abb. 5.5) (Parne et al, 2004). Wenn man das Enhanceosom als einen Raum versteht, in dem sich DNA-gebundene Faktoren des Enhancers und Promotors mit anderen Faktoren über Protein-Protein-Wechselwirkungen vereinigen, um die Transkription zu koordinieren, ist es durchaus denkbar, dass eine zusätzliche Komponente bestehend aus Isolator-DNA, CTCF, TR und assoziierte Faktoren den funktionellen Zusammenbau dieser räumlichen Struktur zerstört. Alle Faktoren sind weiterhin vorhanden, das belegen diese Studien, aber das funktionelle Zusammenwirken dieser Faktoren ist nicht mehr gegeben, so dass die Transkription nicht mehr erfolgen kann.

In diesem Zusammenhang fügt sich auch die Tatsache ein, dass CTCF und RNA Polymerase II physisch miteinander interagieren können (Klenova et al., 1993). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Bindung von CTCF an das F1-Element zu einer beträchtlichen DNA-Biegung führt (Arnold et al., 1996). Dies könnte die Ausbildung von Chromatinschleifen erleichtern.

Erstaunlich ist der Befund, dass die Anwesenheit von Hormon, also die Aufhebung der Enhancer-Blockade, zu einer Dissoziation von CTCF vom Promotor und Enhancer führt, während RNA Polymerase II weiterhin am Enhancer und Promotor, aber nicht am Isolator, detektiert wird (Abb. 5.4). Dies würde für eine Dissoziation des Isolators vom Promotor sprechen, nur der Enhancer kann noch auf den Promotor über einen physischen Kontakt (RNA Polymerase II) wirken und das Gen wird so transkribiert. Dieses Ergebnis zeigt zum ersten Mal ein Beispiel, dass T3 die Ausbildung von Chromatinschleifen verändert, was in diesem Falle zu einer Auflösung der Enhancer-Blockade führt.

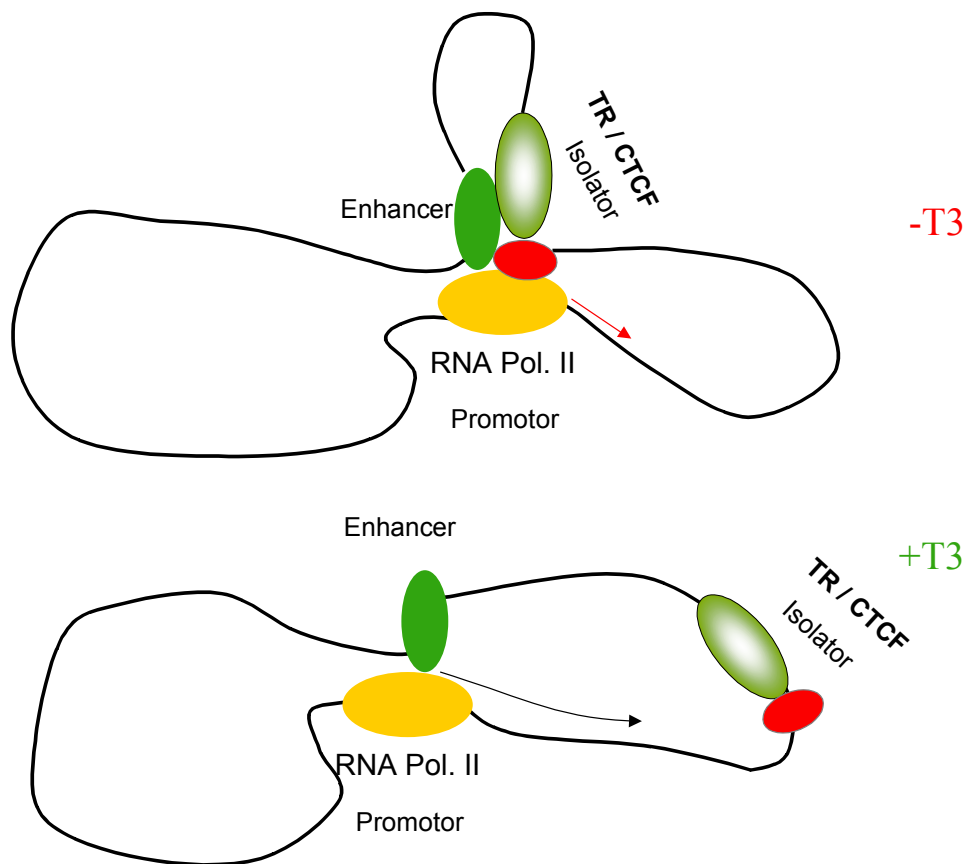


Abb. 5.4: Modell der Enhancer-Blockade und Aufhebung der Enhancer-Blockade in der Anwesenheit von T3.

Schematische Darstellung der RNA Polymerase II- und CTCF-Rekrutierung am Promotor, Enhancer und Isolator. Die Elemente sind durch ihre Proteine dargestellt (RNA Polymerase II: gelber Kreis – Promotor; CTCF/TR: roter und grüner Kreis – Isolator; Enhancer-bindendes Protein: grüner Kreis – Enhancer). Die Gentranskription in der Anwesenheit von Hormon (+T3) wird als schwarzer Pfeil, die Blockierung des Enhancers und somit die Verminderung der Gentranskription in Abwesenheit von Hormon (-T3) als roter Pfeil dargestellt.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTCF und TR in der Enhancer-Blockade synergieren. Darüber hinaus konnte ein Mechanismus, der diesem Synergismus zugrunde liegt, aufgedeckt werden: die Tatsache, dass CTCF in der Abwesenheit von TR in geringerem Ausmaß an F1 bindet. Der nächste Schritt besteht nun darin, herauszufinden, was die Ursache hierfür ist. Denkbar wäre eine posttranslationale Modifizierung von CTCF durch TR-rekrutierte Cofaktoren, die eine CTCF-Bindung erst ermöglichen. Ein weiterer Grund könnte auch die Positionierung von Nukleosomen am F1F2-Element sein, die sich durch Bindung von TR verändert und so eine CTCF-Bindung ermöglicht. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu testen, ob F1 durch andere CTCF-Bindestellen ersetzt werden könnte. Es stellt sich also die Frage, ob die benachbarte Positionierung eines TRE jede Bindestelle zu einer schwachen CTS macht, oder dies nur auf die natürlichen

kombinierte CTCF/TR-Bindestellen zutrifft. In diesem Fall wäre es interessant herauszufinden, worin sich jene CTS von anderen unterscheidet. Untersucht werden könnte z.B. ob für die zusammengesetzten Bindestellen für CTCF und TR andere Zinkfinger von CTCF für die DNA-Bindung zum Einsatz kommen.

Um weitere Faktoren zu finden, die in der hormonsensitiven Enhancer-Blockade involviert sind, wäre es interessant, die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte CTCF-Domäne für Komplexaufreinigungen zu verwenden. Hierfür könnte die Domäne, die Enhancer-Blockade vermittelt, (CTCT-NT) und die Domäne, die für die hormonsensitive Enhancer-Blockade benötigt wird, (CTCF-NT-ZF) gegenüber gestellt werden.

Der Befund, dass in der Abwesenheit von Hormon, CTCF und RNA Polymerase II auf dem Enhancer, Promotor und Isolator präzipitiert werden können, spricht für das Chromatinschleifen-Modell aus. Die Frage stellt sich hier, wie CTCF störend auf den Aufbau eines Enhanceosoms wirken kann.

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Hormon die Rekrutierung von CTCF am Enhancer und Promotor aufhebt. Zum einen könnte hier untersucht werden, ob die Interaktion von CTCT/TR mit der RNA Polymerase II hormonsensitiv ist. Da der Hauptinteraktionsbereich zwischen CTCF und TR im CTCF-ZF und TR-DBD liegt und T3 die CTCF/TR-Interaktion leicht abschwächt und dies vermutlich zu einer Konformationsänderung führt, wäre vorstellbar, dass die Anwesenheit von Hormon, die CTCF-RNA Polymerase II-Interaktion verhindert.

Da Enhanceosome in der Vergangenheit bereits erfolgreich kristallisiert wurden, würde idealerweise eine solche Kristallisation mit anschließender Röntgenstruktur-Analyse in der An- bzw. Abwesenheit von T3 Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Enhancer-Blockade geben.

6 LITERATUR

- Antes, T. J., S. J. Namciu, R. E. Fournier, and B. Levy-Wilson. 2001. The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry* 40:6731-42.
- Arnold, R., M. Burcin, B. Kaiser, M. Muller, and R. Renkawitz. 1996. DNA bending by the silencer protein NeP1 is modulated by TR and RXR. *Nucleic Acids Res* 24:2640-7.
- Ausubel, F. 1989 *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons.
- Ausubel F. M., B. R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman I. G., Smith J. A., Struhl K. 1989. *Current protocols in molecular biology* Greene Publishing associates and Wiley-Interscience.
- Awad, T. A., J. Bigler, J. E. Ulmer, Y. J. Hu, J. M. Moore, M. Lutz, P. E. Neiman, S. J. Collins, R. Renkawitz, V. V. Lobanenkova, and G. N. Filippova. 1999. Negative transcriptional regulation mediated by thyroid hormone response element 144 requires binding of the multivalent factor CTCF to a novel target DNA sequence. *J Biol Chem* 274:27092-8.
- Baniahmad, A., C. Steiner, A. C. Kohne, and R. Renkawitz. 1990. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61:505-14.
- Baniahmad, C., A. Baniahmad, and B. W. O'Malley. 1994. A rapid method combining a functional test of fusion proteins in vivo and their purification. *Biotechniques* 16:194-6.
- Barettino, D., T. H. Bugge, P. Bartunek, M. D. Vivanco Ruiz, V. Sonntag-Buck, H. Beug, M. Zenke, and H. G. Stunnenberg. 1993. Unliganded T3R, but not its oncogenic variant, v-erbA, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *Embo J* 12:1343-54.
- Belandia, B., M. J. Latasa, A. Villa, and A. Pascual. 1998. Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 273:30366-71.
- Bell, A. C., and G. Felsenfeld. 1999. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* 9:191-8.
- Bell, A. C., and G. Felsenfeld. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405:482-5.
- Bell, A. C., A. G. West, and G. Felsenfeld. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98:387-96.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
- Bonifer, C., A. Hecht, H. Saueressig, D. M. Winter, and A. E. Sippel. 1991. Dynamic chromatin: the regulatory domain organization of eukaryotic gene loci. *J Cell Biochem* 47:99-108.
- Brent, G. A., M. K. Dunn, J. W. Harney, T. Gulick, P. R. Larsen, and D. D. Moore. 1989. Thyroid hormone aporeceptor represses T3-inducible promoters and blocks activity of the retinoic acid receptor. *New Biol* 1:329-36.
- Burcin, M., R. Arnold, M. Lutz, B. Kaiser, D. Runge, F. Lottspeich, G. N. Filippova, V. V. Lobanenkova, and R. Renkawitz. 1997. Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol Cell Biol* 17:1281-8.
- Burke, L. J., R. Zhang, M. Bartkuhn, V. K. Tiwari, G. Tavoosidana, S. Kurukuti, C. Weth, J. Leers, N. Galjart, R. Ohlsson, and R. Renkawitz. 2005. CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin. *Embo J* 24:3291-300.
- Burke, L. J., R. Zhang, M. Lutz, and R. Renkawitz. 2002. The thyroid hormone receptor and the insulator protein CTCF: two different factors with overlapping functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:49-57.
- Burton, T., B. Liang, A. Dibrov, and F. Amara. 2002. Transforming growth factor-beta-induced transcription of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein gene involves interaction between the CTCF-complex and Smads. *Biochem Biophys Res Commun* 295:713-23.
- Capelson, M., and V. G. Corces. 2004. Boundary elements and nuclear organization. *Biol Cell* 96:617-29.
- Chao, W., K. D. Huynh, R. J. Spencer, L. S. Davidow, and J. T. Lee. 2002. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 295:345-7.
- Claessens, F., and D. T. Gewirth. 2004. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 40:59-72.

- Damm, K., C. C. Thompson, and R. M. Evans. 1989. Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* 339:593-7.
- Dana, S. L., P. A. Hoener, D. A. Wheeler, C. B. Lawrence, and D. P. McDonnell. 1994. Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells. *Mol Endocrinol* 8:1193-207.
- Defossez, P. A., K. F. Kelly, G. J. Filion, R. Perez-Torrado, F. Magdinier, H. Menoni, C. L. Nordgaard, J. M. Daniel, and E. Gilson. 2005. The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J Biol Chem* 280:43017-23.
- Docquier, F., D. Farrar, V. D'Arcy, I. Chernukhin, A. F. Robinson, D. Loukinov, S. Vatolin, S. Pack, A. Mackay, R. A. Harris, H. Dorricott, M. J. O'Hare, V. Lobanenko, and E. Klenova. 2005. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Res* 65:5112-22.
- Dressel, U., D. Thormeyer, B. Altincicek, A. Paululat, M. Eggert, S. Schneider, S. P. Tenbaum, R. Renkawitz, and A. Baniahmad. 1999. Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:3383-94.
- Drueppel, L., K. Pfeleiderer, A. Schmidt, W. Hillen, and C. Berens. 2004. A short autonomous repression motif is located within the N-terminal domain of CTCF. *FEBS Lett* 572:154-8.
- Dunn, K. L., H. Zhao, and J. R. Davie. 2003. The insulator binding protein CTCF associates with the nuclear matrix. *Exp Cell Res* 288:218-23.
- Dussault, J. H., and J. Ruel. 1987. Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol* 49:321-34.
- Filippova, G. N., C. P. Thienes, B. H. Penn, D. H. Cho, Y. J. Hu, J. M. Moore, T. R. Klesert, V. V. Lobanenko, and S. J. Tapscott. 2001. CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet* 28:335-43.
- Fuks, F., P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, and T. Kouzarides. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278:4035-40.
- Fukuchi, K., K. Kamino, S. S. Deeb, A. C. Smith, T. Dang, and G. M. Martin. 1992. Overexpression of amyloid precursor protein alters its normal processing and is associated with neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 182:165-73.
- Georgel, P. T., T. Tsukiyama, and C. Wu. 1997. Role of histone tails in nucleosome remodeling by *Drosophila* NURF. *Embo J* 16:4717-26.
- Giguere, V., E. S. Ong, P. Segui, and R. M. Evans. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-9.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
- Hark, A. T., C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. Levorse, and S. M. Tilghman. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405:486-9.
- Hollenberg, A. N., T. Monden, and F. E. Wondisford. 1995. Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem* 270:14274-80.
- Holmgren, C., C. Kanduri, G. Dell, A. Ward, R. Mukhopadhyay, M. Kanduri, V. Lobanenko, and R. Ohlsson. 2001. CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. *Curr Biol* 11:1128-30.
- Huber, M. C., T. Graf, A. E. Sippel, and C. Bonifer. 1995. Dynamic changes in the chromatin of the chicken lysozyme gene domain during differentiation of multipotent progenitors to macrophages. *DNA Cell Biol* 14:397-402.
- Jenuwein, T., and C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-80.
- Johnson, P. H., and L. I. Grossman. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16:4217-25.
- Kaelin, W. G., Jr., D. C. Pallas, J. A. DeCaprio, F. J. Kaye, and D. M. Livingston. 1991. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64:521-32.
- Kanduri, C., G. Fitzpatrick, R. Mukhopadhyay, M. Kanduri, V. Lobanenko, M. Higgins, and R. Ohlsson. 2002a. A differentially methylated imprinting control region within the *Kcnq1* locus harbors a methylation-sensitive chromatin insulator. *J Biol Chem* 277:18106-10.

- Kanduri, C., C. Holmgren, M. Pilartz, G. Franklin, M. Kanduri, L. Liu, V. Ginjala, E. Ulleras, R. Mattsson, and R. Ohlsson. 2000. The 5' flank of mouse H19 in an unusual chromatin conformation unidirectionally blocks enhancer-promoter communication. *Curr Biol* 10:449-57.
- Kanduri, M., C. Kanduri, P. Mariano, A. A. Vostrov, W. Quitschke, V. Lobanenko, and R. Ohlsson. 2002b. Multiple nucleosome positioning sites regulate the CTCF-mediated insulator function of the H19 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 22:3339-44.
- Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, and J. W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-5.
- Klenova, E. M., I. V. Chernukhin, A. El-Kady, R. E. Lee, E. M. Pugacheva, D. I. Loukinov, G. H. Goodwin, D. Delgado, G. N. Filippova, J. Leon, H. C. Morse, 3rd, P. E. Neiman, and V. V. Lobanenko. 2001. Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol* 21:2221-34.
- Klenova, E. M., R. H. Nicolas, H. F. Paterson, A. F. Carne, C. M. Heath, G. H. Goodwin, P. E. Neiman, and V. V. Lobanenko. 1993. CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol Cell Biol* 13:7612-24.
- Klenova, E. M., R. H. Nicolas, S. U. A. F. Carne, R. E. Lee, V. V. Lobanenko, and G. H. Goodwin. 1997. Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. *Nucleic Acids Res* 25:466-74.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Latasa, M. J., B. Belandia, and A. Pascual. 1998. Thyroid hormones regulate beta-amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells. *Endocrinology* 139:2692-8.
- Lebel, J. M., J. H. Dussault, and J. Puymirat. 1994. Overexpression of the beta 1 thyroid receptor induces differentiation in neuro-2a cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2644-8.
- Li, Q., G. Barkess, and H. Qian. 2006. Chromatin looping and the probability of transcription. *Trends Genet* 22:197-202.
- Li, T., Z. Lu, and L. Lu. 2004. Regulation of eye development by transcription control of CCCTC binding factor (CTCF). *J Biol Chem* 279:27575-83.
- Liu, L., D. M. Scolnick, R. C. Trievel, H. B. Zhang, R. Marmorstein, T. D. Halazonetis, and S. L. Berger. 1999. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19:1202-9.
- Lobanenko, V. V., R. H. Nicolas, V. V. Adler, H. Paterson, E. M. Klenova, A. V. Polotskaja, and G. H. Goodwin. 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5:1743-53.
- Louie, M. C., H. Q. Yang, A. H. Ma, W. Xu, J. X. Zou, H. J. Kung, and H. W. Chen. 2003. Androgen-induced recruitment of RNA polymerase II to a nuclear receptor-p160 coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2226-30.
- Lutz, M., A. Baniahmad, and R. Renkawitz. 2000a. Modulation of thyroid hormone receptor silencing function by co-repressors and a synergizing transcription factor. *Biochem Soc Trans* 28:386-9.
- Lutz, M., L. J. Burke, G. Barreto, F. Goeman, H. Greb, R. Arnold, H. Schultheiss, A. Brehm, T. Kouzarides, V. Lobanenko, and R. Renkawitz. 2000b. Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 28:1707-13.
- Lutz, M., L. J. Burke, P. LeFevre, F. A. Myers, A. W. Thorne, C. Crane-Robinson, C. Bonifer, G. N. Filippova, V. Lobanenko, and R. Renkawitz. 2003. Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. *Embo J* 22:1579-87.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-62.
- Mattson, M. P., S. W. Barger, B. Cheng, I. Lieberburg, V. L. Smith-Swintosky, and R. E. Rydel. 1993. beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16:409-14.
- McKenna, N. J., and B. W. O'Malley. 2001. Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann N Y Acad Sci* 949:3-5.

- Metivier, R., G. Penot, M. R. Hubner, G. Reid, H. Brand, M. Kos, and F. Gannon. 2003. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-63.
- Miyamoto, T., T. Kakizawa, and K. Hashizume. 1999. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol* 19:2644-9.
- Mukhopadhyay, R., W. Yu, J. Whitehead, J. Xu, M. Lezcano, S. Pack, C. Kanduri, M. Kanduri, V. Ginja, A. Vostrov, W. Quitschke, I. Chernukhin, E. Klenova, V. Lobanenko, and R. Ohlsson. 2004. The binding sites for the chromatin insulator protein CTCF map to DNA methylation-free domains genome-wide. *Genome Res* 14:1594-602.
- Naar, A. M., J. M. Boutin, S. M. Lipkin, V. C. Yu, J. M. Holloway, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1991. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65:1267-79.
- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, C. N. Mariash, W. B. Kinlaw, N. C. Wong, and H. C. Freake. 1987. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev* 8:288-308.
- Pant, V., P. Mariano, C. Kanduri, A. Mattsson, V. Lobanenko, R. Heuchel, and R. Ohlsson. 2003. The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes Dev* 17:586-90.
- Parnell, T. J., and P. K. Geyer. 2000. Differences in insulator properties revealed by enhancer blocking assays on episomes. *Embo J* 19:5864-74.
- Perez-Juste, G., S. Garcia-Silva, and A. Aranda. 2000. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 275:1307-14.
- Radloff, R., W. Bauer, and J. Vinograd. 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57:1514-21.
- Rasko, J. E., E. M. Klenova, J. Leon, G. N. Filippova, D. I. Loukinov, S. Vatolin, A. F. Robinson, Y. J. Hu, J. Ulmer, M. D. Ward, E. M. Pugacheva, P. E. Neiman, H. C. Morse, 3rd, S. J. Collins, and V. V. Lobanenko. 2001. Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. *Cancer Res* 61:6002-7.
- Recillas-Targa, F., A. C. Bell, and G. Felsenfeld. 1999. Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14354-9.
- Renaud, S., D. Loukinov, F. T. Bosman, V. Lobanenko, and J. Benhattar. 2005. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res* 33:6850-60.
- Roberts, R. J., and D. Macelis. 1991. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res* 19 Suppl:2077-109.
- Rosenfeld, M. G., and C. K. Glass. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276:36865-8.
- Schoenherr, C. J., J. M. Levorse, and S. M. Tilghman. 2003. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet* 33:66-9.
- Shang, Y., M. Myers, and M. Brown. 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* 9:601-10.
- Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem* 100:319-23.
- Szabo, P. E., L. Han, J. Hyo-Jung, and J. R. Mann. 2006. Mutagenesis in mice of nuclear hormone receptor binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. *Cytogenet Genome Res* 113:238-46.
- Szabo, P. E., G. P. Pfeifer, and J. R. Mann. 2004. Parent-of-origin-specific binding of nuclear hormone receptor complexes in the H19-Igf2 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 24:4858-68.
- Tagami, T., L. D. Madison, T. Nagaya, and J. L. Jameson. 1997. Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 17:2642-8.
- Thompson, C. C., and R. M. Evans. 1989. Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3494-8.

- Torrano, V., J. Navascues, F. Docquier, R. Zhang, L. J. Burke, I. Chernukhin, D. Farrar, J. Leon, M. T. Berciano, R. Renkawitz, E. Klenova, M. Lafarga, and M. D. Delgado. 2006. Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. *J Cell Sci* 119:1746-59.
- Urnov, F. D., and A. P. Wolffe. 2001. An array of positioned nucleosomes potentiates thyroid hormone receptor action in vivo. *J Biol Chem* 276:19753-61.
- van Driel, R., P. F. Fransz, and P. J. Verschure. 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116:4067-75.
- Vostrov, A. A., and W. W. Quitschke. 1997. The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem* 272:33353-9.
- Vostrov, A. A., M. J. Taheny, and W. W. Quitschke. 2002. A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter. *J Biol Chem* 277:1619-27.
- West, A. G., S. Huang, M. Gaszner, M. D. Litt, and G. Felsenfeld. 2004. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell* 16:453-63.
- Westin, S., M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 2000. Nuclear receptor coactivators. *Adv Pharmacol* 47:89-112.
- Willy, P. J., K. Umesono, E. S. Ong, R. M. Evans, R. A. Heyman, and D. J. Mangelsdorf. 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9:1033-45.
- Wondisford, F. E., H. J. Steinfelder, M. Nations, and S. Radovick. 1993. AP-1 antagonizes thyroid hormone receptor action on the thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem* 268:2749-54.
- Yang, Y., W. W. Quitschke, A. A. Vostrov, and G. J. Brewer. 1999. CTCF is essential for up-regulating expression from the amyloid precursor protein promoter during differentiation of primary hippocampal neurons. *J Neurochem* 73:2286-98.
- Yoshikawa, K., T. Aizawa, and Y. Hayashi. 1992. Degeneration in vitro of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* 359:64-7.
- Yu, W., V. Ginjala, V. Pant, I. Chernukhin, J. Whitehead, F. Docquier, D. Farrar, G. Tavoosidana, R. Mukhopadhyay, C. Kanduri, M. Oshimura, A. P. Feinberg, V. Lobanenko, E. Klenova, and R. Ohlsson. 2004. Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet* 36:1105-10.
- Zhang, R., L. J. Burke, J. E. Rasko, V. Lobanenko, and R. Renkawitz. 2004. Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. *Exp Cell Res* 294:86-93.
- Zhao, H., and A. Dean. 2004. An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucleic Acids Res* 32:4903-19.

7 ANHANG

7.1 Reporterkonstrukte

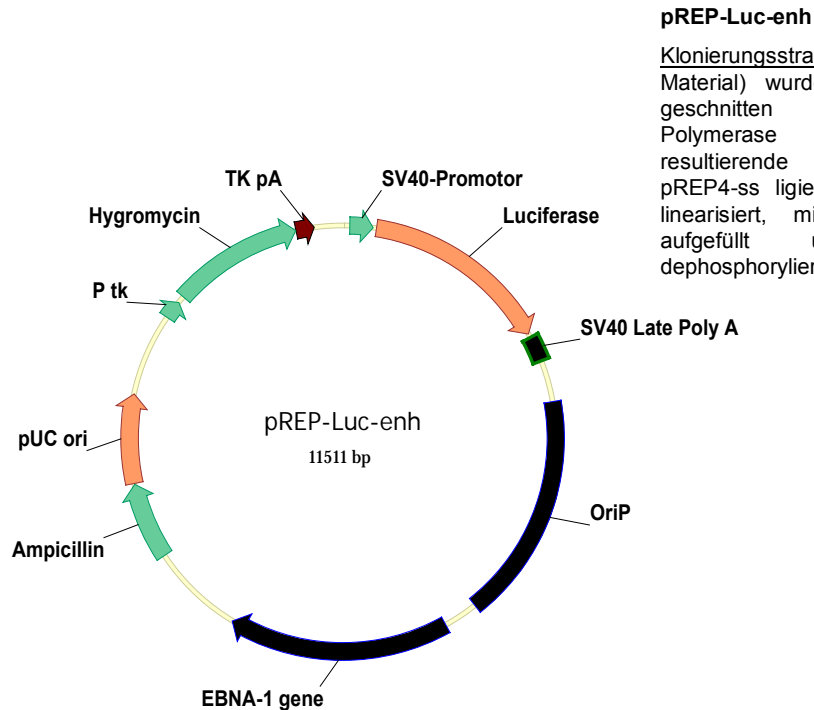
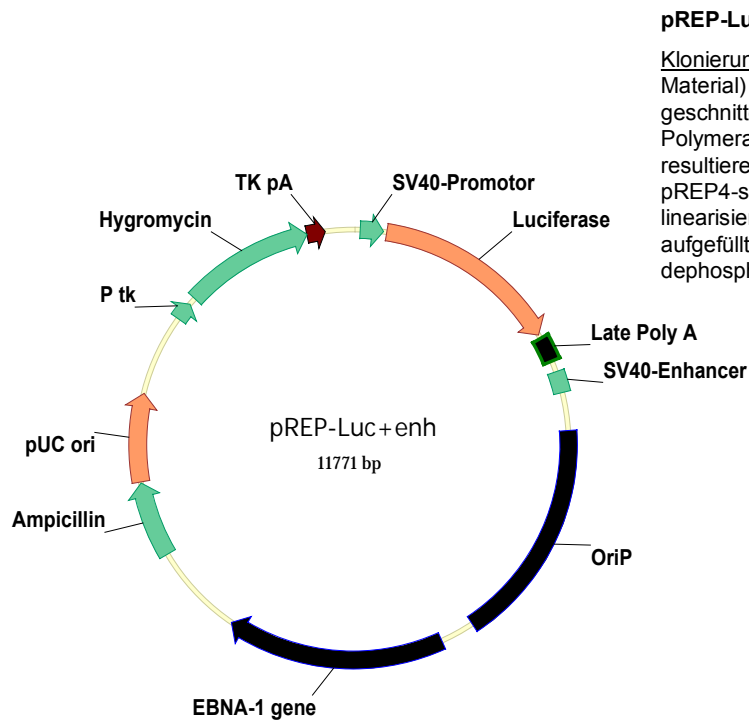


Abb. 7.1: Schematische Darstellung des Konstrukts pREP-Luc-enh.

Der episomale Vektor pREP-Luc-enh wurde für transiente Transfektionen in eukaryontische Zellen verwendet und diente als Repressionskontrolle im Vergleich zu den Vektoren pREP-F1F2-enh und pREP-5xF1F2-enh. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist.

SV40 Late Poly A: Polyadenylierungsstelle des Simian-Virus 40; *OriP*: viraler Replikationsursprung; *EBNA-1 gene*: virales nukleäres Antigen; *Ampicillin*: Ampicillin-Resistenzgen; *pUC ori*: prokaryontischer Replikationsursprung; *P tk*: Promoter der Thymidinkinase (Herpes Simplex-Virus); *Hygromycin*: Hygromycin-Resistenzgen; *TK pA*: Polyadenylierungsstelle der Thymidinkinase (Herpes Simplex-Virus).

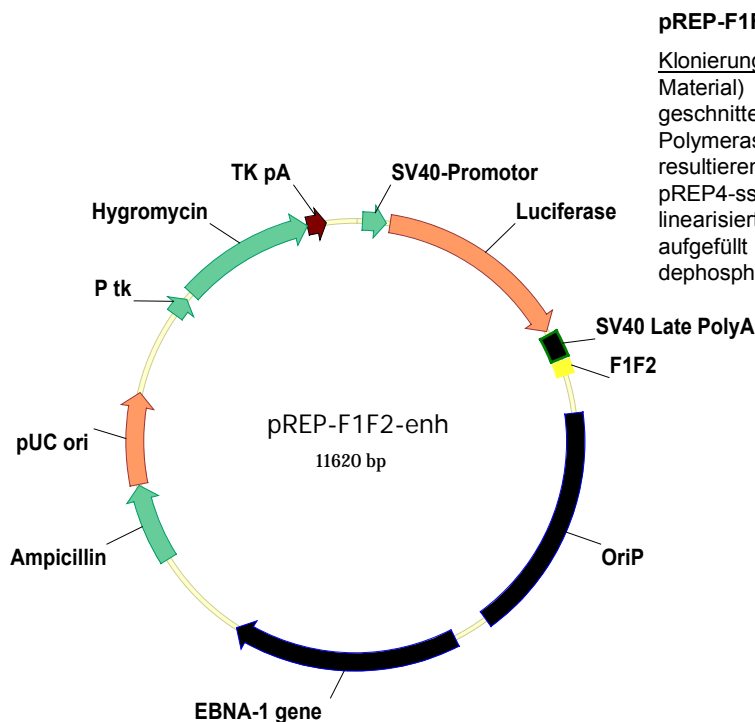


pREP-Luc+enh

Klonierungsstrategie: p3α (siehe Material) wurde mit Sall und XhoI geschnitten und mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Das resultierende Insert wurde mit pREP4-ss ligiert, der zuvor mit NotI linearisiert, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Abb. 7.2: Schematische Darstellung des Konstrukts pREP-Luc+enh.

Der episomale Vektor pREP-Luc+enh wurde für transiente Transfektionen verwendet und diente als Kontrolle im Vergleich zu den Vektoren pREP-4xAPP+enh, -4xAPPmut+enh, -F1F2+enh, -5xF1F2+enh usw. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist und einen SV40-Enhancer. Abkürzungserläuterungen siehe Abb. 6.1.



pREP-F1F2-enh

Klonierungsstrategie: pGL3-F1F2 (siehe Material) wurde mit BclI und XhoI geschnitten und mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Das resultierende Insert wurde mit pREP4-ss ligiert, der zuvor mit NotI linearisiert, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Abb. 7.3: Schematische Darstellung des Konstrukts pREP-F1F2-enh.

Der episomale Vektor pREP-F1F2-enh wurde für transiente Transfektionen verwendet. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist. 5' des Luciferase-Gens wurde das F1F2-Element kloniert. Abkürzungserläuterungen siehe Abb. 6.1.

Der episomale Vektor pREP-5x $F1F2$ +enh wurde für transiente Transfektionen und ChIP-Analysen verwendet. Dieses Konstrukt besitzt zwischen SV40-Promotor und -Enhancer fünf hintereinander geschaltete Kopien des $F1F2$ -Elements.

Sequenz des 5x $F1F2$ -Inserts:

```

      F2                                F1
tacttgacctcagctggggtcaataagtaactaagcaaaaagacacgtaaataccatagctatccagtagagggtctcaatttctcatgtcaaatg
      F2                                F1
cagctctagtatacttgacctcagctggggtcaataagtaactaagcaaaaagacacgtaaataccatagctatccagtagagggtctcaatttctt
      F2
catgtcaaatgcagctctagtggatccaaagaattctagtatacttgacctcagctggggtcaataagtaactaagcaaaaagacacgtaaata
      F1                                F2
ccatagctatccagtagagggtctcaatttctcatgtcaaatgcagctctagtatacttgacctcagctggggtcaataagtaactaagcaaaaag
      F1                                F2
acacgtaaataccatagctatccagtagagggtctcaatttctcatgtcaaatgcagctctagtatacttgacctcagctggggtcaataagtaact
      F1                                F2
aagcaaaaagacacgtaaataccatagctatccagtagagggtctcaatttctcatg
```

- **Konstrukt pREP- $F1mutF2$ +enh**

Klonierungsstrategie: pGL3- $F1mutF2$ wurde mit EcoRV und NheI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pREP4-ss ligiert. Dieser wurde zuvor mit NotI linearisiert, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, nochmals mit NheI geschnitten und anschließend mit CIAP dephosphoryliert.

Der episomale Vektor pREP- $F1F2$ +enh wurde für transiente Transfektionen und ChIP-Analysen verwendet. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist. Zwischen den Promotor und einen SV40-Enhancer wurde das $F1mutF2$ -Element kloniert.

Sequenz des $F1mutF2$ -Inserts:

```

      F2                                F1mut
cctgagagacctgagttcgtaacttgacctcagctggggtcaataagtaactaagcaaaaagacatgtaaataccatagctatccagtagaaa
tctcaatttcttcatgtcaaatgcagc
```

- **Konstrukt pREP- $F1F2mut$ +enh**

Klonierungsstrategie: pGL3- $F1F2mut$ wurde mit EcoRV und NheI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pREP4-ss ligiert. Dieser wurde zuvor mit NotI linearisiert, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, nochmals mit NheI geschnitten und anschließend mit CIAP dephosphoryliert.

Der episomale Vektor pREP- $F1F2$ +enh wurde für transiente Transfektionen und ChIP-Analysen verwendet. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist. Zwischen den Promotor und einen SV40-Enhancer wurde das $F1F2mut$ -Element kloniert.

Sequenz des $F1F2mut$ -Inserts:

```

      F2mut                                F1
cctgagagacctgagttcgtaacttgggttcagctgggtcccaataagtaactaagcaaaaagacatgtaaataccatagctatccagtagagg
tctcaatttcttcatgtcaaatgcagc
```


- **Konstrukt pREP-4xAPP+enh**

Klonierungsstrategie:

pGL3control-4xAPP wurde mit XmnI und BamHI geschnitten und mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend folgte ein erneuter Verdau mit NheI. Das daraus resultierende Insert von 3400 bp wurde mit dem Vektor pREP-ss ligiert, der zuvor mit NotI geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und nochmals mit NheI verdaut wurde.

Der episomale Vektor pREP-4xAPP+enh wurde für transiente Transfektionen in eukaryontische Zellen eingesetzt. Dieses Konstrukt besitzt zwischen dem SV40-Promotor und -Enhancer vier Kopien der kombinierten potentiellen CTCF/TR-Bindestellen des murinen APP β -Promotors.

Sequenz des 4xAPP-Inserts:

CTS

actagaagccggcagagtcagctgatccgcccacccggctcgccacccgcagagacccctagcggagcctcggggagctgcgcccgcg

cgcagcgggagggaacccagagcccacaggtgcggcgctctgggctaaggggagccgcgctcccgatggggcttggaaccaagtggg

TRE

gagtgatctgggtcagggagaggacccacacaatcgggagaaggtgaaccactagaagccggcagagtcagctgatccgcccacccggc

CTS

tcgccacccgcagagacccctagcggagcctcggggagctgcgcccgcagcgcagcgggagggaacccagagcccacaggtgcggcg

TRE

cttgggctaaggggagccgcgctcccgatggggcttggaaccaagtggggagtgatctgggtcagggagaggacccacacaatcgggag

CTS

aaggtgaaccactagaagccggcagagtcagctgatccgcccacccggctcgccacccgcagagacccctagcggagcctcggggag

ctgcgcccgcagcgcagcgggagggaacccagagcccacaggtgcggcgctctgggctaaggggagccgcgctcccgatggggcttgga

TRE

accaagtggggagtgatctgggtcagggagaggacccacacaatcgggagaaggtgaaccactagaagccggcagagtcagctgatccc

CTS

gccacccggctcgccacccgcagagacccctagcggagcctcggggagctgcgcccgcagcgcagcgggagggaacccagagcccac

TRE

aggtgcggcgctctgggctaaggggagccgcgctcccgatggggcttggaaccaagtggggagtgatctgggtcagggagaggacccca

caatcgggagaaggtgaacc

- **Konstrukt pREP-4xAPPmut**

Klonierungsstrategie:

pGL3control-4xAPPmut wurde mit XmnI und BamHI geschnitten und mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend folgte ein erneuter Verdau mit NheI. Das daraus resultierende Insert von 3400 bp wurde mit dem Vektor pREP-ss ligiert, der zuvor mit NotI geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und nochmals mit NheI verdaut wurde.

Der episomale Vektor pREP-4xAPP+enh wurde für transiente Transfektionen eingesetzt. Dieses Konstrukt besitzt zwischen dem SV40-Promotor und -Enhancer vier Kopien der kombinierten potentiellen CTCF/TR-Bindestellen des murinen APP β -Promotors mit mutierten CTCF-Bindestellen.

Sequenz des 4xAPPmut-Inserts:

CTS

actagaagccggcagagtcagctgatccgcccacccggctcgccacccgcagagacccgaagcggagcctcggggctgctgcgcccgcg

cgcagcgggagggaacccagagcccacaggtgcggcgctctgggctaaggggagccgcgctcccgatggggcttggaaccaagtggg

TRE

gagtgatctgggtcagggagaggacccacacaatcgggagaaggtgaaccactagaagccggcagagtcagctgatccgcccacccggc

CTS

tcgccacccgcagagacccgaagcggagcctcggggctgctgcgcccgcagcgcagcgggagggaacccagagcccacaggtgcggcg

TRE

cttgggctaaggggagccgcgctcccgatggggcttggaaccaagtggggagtgatctgggtcagggagaggacccacacaatcgggag

CTS

aagggtgaaccactagaagccggcagagtcagctgatcccgccacccggctcgccacccgcagagacccgaagcggagcctcggggtg
 ctgcgcccagcgcagcgggaggcaaccagagcccacaggtgcggcgtcttgggctaaggggagccgcgctcccgatggggtctggga
 TRE
 accaagttggggagtgtatctgggtcagggagaggaccccacaatcgggagaaggtgaaccactagaagccggcagagtcagctgatccc
 CTS
 gccacccggctcgccacccgcagagacccgaagcggagcctcggggtgctgcgcccagcgcagcgggaggcaaccagagcccac
 TRE
 aggtgcggcgtcttgggctaaggggagccgcgctcccgatggggtctgggaaccaagttggggagtgtatctgggtcagggagaggacccca
 caatcgggagaaggtgaacc

Die folgenden episomalen Plasmide basieren auf dem Vektor pREPH19A (Kanduri et al., 2000):

- **Konstrukt pREPH19-F1F2**

Klonierungsstrategie:

Das F1F2-Element wurde aus genomischer Hühner-DNA mit den Primern S3 und A3 amplifiziert. Anschließend erfolgte eine zweite PCR mit den Primern 2nd S3 und 2nd A3 (*Nested PCR*). Das resultierende Fragment wurde in pBsk zwischenkloniert, der zuvor mit EcoRV geschnitten wurde. Die Orientierung des Inserts wurde mit PvuII kontrolliert. Das F1F2-Element wurde mit SmaI und HincII aus pBsk herausgeschnitten mit Klenow aufgefüllt. Das daraus resultierende Insert wurde mit pREPH19A (Kanduri et al., 2000) ligiert, der zuvor mit XhoI geschnitten, mit Klenow aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert worden war. Die Orientierung des Inserts wurde mit Sall oder PvuII überprüft.

Der episomale Vektor pREPH19-F1F2 wurde in transienten Transfektionen in eukaryontische Zellen eingesetzt. Er besitzt zwischen SV40-Enhancer und GFP-Reporter das F1F2-Element.

- **Konstrukt pREPH19-F2F1**

Klonierungsstrategie:

Das F1F2-Element wurde aus genomischer Hühner-DNA mit den Primern S3 und A3 amplifiziert. Anschließend erfolgte eine zweite PCR mit den Primern 2nd S3 und 2nd A3 (*Nested PCR*). Das resultierende Fragment wurde in pBsk zwischenkloniert, der zuvor mit EcoRV geschnitten wurde. Die Orientierung des Inserts wurde mit PvuII kontrolliert. Das F1F2-Element wurde mit SmaI und HincII aus pBsk herausgeschnitten mit Klenow aufgefüllt. Das daraus resultierende Insert wurde mit pREPH19A (Kanduri et al., 2000) ligiert, der zuvor mit XhoI geschnitten, mit Klenow aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert worden war. Die Orientierung des Inserts wurde mit Sall oder PvuII überprüft.

Das Plasmid pREPH19-F2F1 diente der transienten Transfektion. Der Hühner-Lysozymisolator wurde in der reversen Orientierung (F2F1) zwischen SV40-Enhancer und GFP-Reporter kloniert.

Sequenz des F1F2- bzw. F2F1-Inserts:

F1F2

gctgcatttgacatgaagaaattgagacctactggatagctatgggtatttacgtgtcttttgccttagttactattgacccagctgaggtcaagtta
 cgaactcaggtctctcaggc

- **Konstrukt pREPH19-TR-N**

Klonierungsstrategie:

Das humane TR-N-Element wurde aus dem Vektor p(TRN)P2luc mit XbaI herausgeschnitten und mit Klenow aufgefüllt. Das resultierende Insert wurde mit pREPH19A (Kanduri et al., 2000) ligiert, der zuvor mit XhoI geschnitten, mit Klenow aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert worden war. Die Orientierung des Inserts wurde mit Hind III überprüft.

Der episomale Vektor pREPH19-TR-N wurde für Transfektionen in eukaryontische Zellen verwendet. Er ist charakterisiert durch die Anwesenheit des humanen TR-N-Isolators zwischen SV40-Enhancer und GFP-Reporter.

- **Konstrukt pREPH19-N-TR**

Klonierungsstrategie:

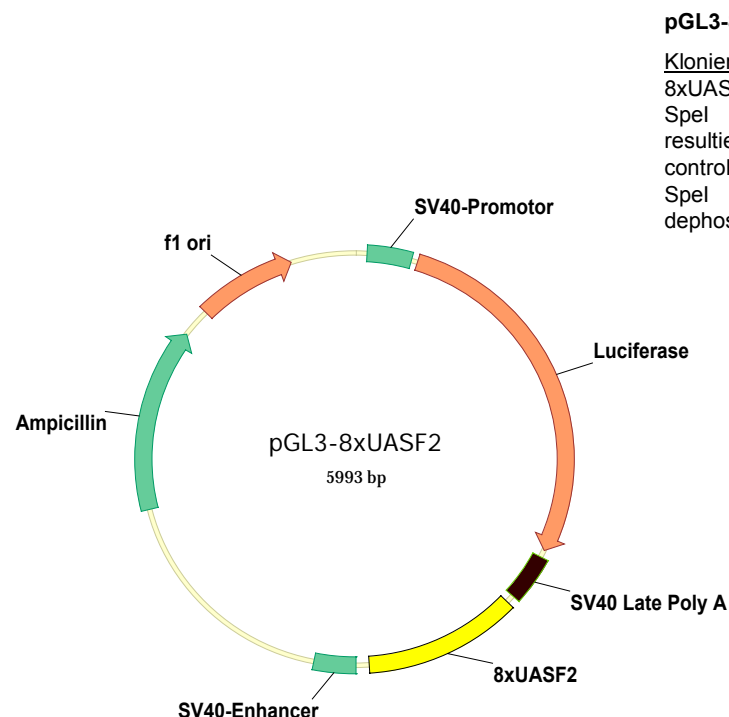
Das humane TR-N-Element wurde aus dem Vektor p(TRN)P2luc mit XbaI herausgeschnitten und mit Klenow aufgefüllt. Das resultierende Insert wurde mit pREPH19A (Kanduri et al., 2000) ligiert, der zuvor mit XhoI geschnitten, mit Klenow aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert worden war. Die Orientierung des Inserts wurde mit HindIII überprüft.

Das Plasmid pREPH19-N-TR diente der eukaryontischen Expression. Zwischen SV40-Enhancer und GFP-Reportergen befindet sich das TR-N-Element in reverser Orientierung.

Sequenz des TR-N-Inserts:

TR N

tctagaagcttctgctcctgccccacctgaccccgccctcggtgacatccaggcgcgatgatctctgctgccagtagagggcacacttacttt
actttctaga



pGL3-8xUASF2

Klonierungsstrategie: pBK-CMV-8xUASF2 (siehe Material) wurde mit SpeI und XbaI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGL3-control ligiert. Dieser wurde zuvor mit SpeI linearisiert und mit CIAP dephosphoryliert.

Abb. 7.5: Schematische Darstellung des Konstrukts pGL3-8xUASF2.

Der Vektor pGL3-8xUASF2 wurde für transiente Transfektionen in eukaryontische Zellen verwendet. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist. Zwischen SV40-Enhancer und -Promotor befindet sich die 8fach multimerisierte Bindestelle UASF2. SV40 Late Poly A: Polyadenylierungsstelle des Simian-Virus 40; f1 ori: Phagen-Replikationsursprung; Ampicillin: Ampicillin-Resistenzgen; Luciferase: Luciferase-Reportergen; SV40-Promotor: Promotor des Simian-Virus 40; 8xUASF2: multimerisierte Bindestelle für Gal-DBD und TR

Sequenz des 8xUASF2-Inserts

```

          F2                                UAS
agtcgacgtaactgacctcagctggggtcaataatcgactcggaggacagctactccgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcga
cgt

          F2                                UAS
aacttgacctcagctggggtcaataatcgactcggaggacagctactccgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcgacgtaacttg
acct

          F2                                UAS                                F2
cagctggggtcaataatcgactcggaggacagctactccgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcgacgtaacttgacctcagctg
ggg

          UAS                                F2
tcataatcgactcggaggacagctactccgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcgacgtaacttgacctcagctggggtcaata
atcg

          UAS                                F2
actcggaggacagctactccgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcgacgtaacttgacctcagctggggtcaataatcgactcgg
agg

          UAS                                F2                                UAS
acagtactccgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcgacgtaacttgacctcagctggggtcaataatcgactcggaggacagta
ctc

          F2                                UAS
cgcttcgacctgcaggcatgcaagcttactagagtcgacgtaacttgacctcagctggggtcaataatcgactcggaggacagctactccgcttc
gacctgcaggcatgcaagcttactagt
  
```

7.2 Plasmide für die bakterielle Expression

pGEX-4T1avi-TRβ

Klonierungsstrategie: Der hTRβ wurde mit den Primern hTRbS und hTRbAS aus pRS-hTRβ (siehe Material) amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGEX-4T1avi ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

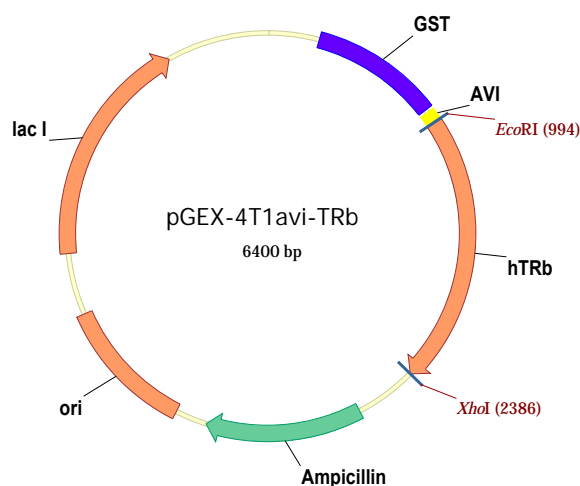


Abb. 7.6: Schematische Darstellung des Konstrukts pGEX-4T1avi-TRβ.

Das Plasmid ermöglicht die Expression von GST-TRβ in prokaryotischen Organismen.

Ampicillin: Ampicillin-Resistenz; *GST:* Glutathion-S-Transferase, dient der Immobilisierung an Glutathion-Sepharose Beads; *lac I:* codiert den lac-Inhibitor (Repressor); *avi:* Avidin-tag; *ori:* Replikationsursprung; *hTRb:* codiert für die AS 1-465 des humanen TRβ

Die folgenden Expressionsplasmide basieren ebenfalls auf pGEX-4T1avi und wurden in einer ähnlichen Weise kloniert:

- **Konstrukt pGEX-4T1avi-hTR β DBD**

Klonierungsstrategie: Die DBD des hTR β wurde mit den Primern hTRbDBDs und hTRbDBDas aus pRS-hTR β amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGEX-4T1avi ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Das Plasmid ermöglicht die Expression von GST-TR β DBD (AS 110-182) in prokaryotischen Organismen.

- **Konstrukt pGEX-4T1avi-hTR β LBD**

Klonierungsstrategie: Die LBD des hTR β wurde mit den Primern hTRbCTs und hTRbAS aus pRS-hTR β amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGEX-4T1avi ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Das Plasmid ermöglicht die Expression von GST-TR β LBD (AS 183-465) in prokaryotischen Organismen.

- **Konstrukt pGEX-4T1avi-hRXR α NT**

Klonierungsstrategie: Der N-Terminus des hRXR α wurde mit den Primern hRXRaS und hRXRaNTAS aus pSG5-hRXR α amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGEX-4T1avi ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Das Plasmid ermöglicht die Expression von GST-RXR α NT (AS 1-139) in prokaryotischen Organismen.

- **Konstrukt pGEX-4T1avi-hRXR α DBD**

Klonierungsstrategie: Die DBD des hRXR α wurde mit den Primern hRXRaDBDS und hRXRaDBDAS aus pSG5-hRXR α amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGEX-4T1avi ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

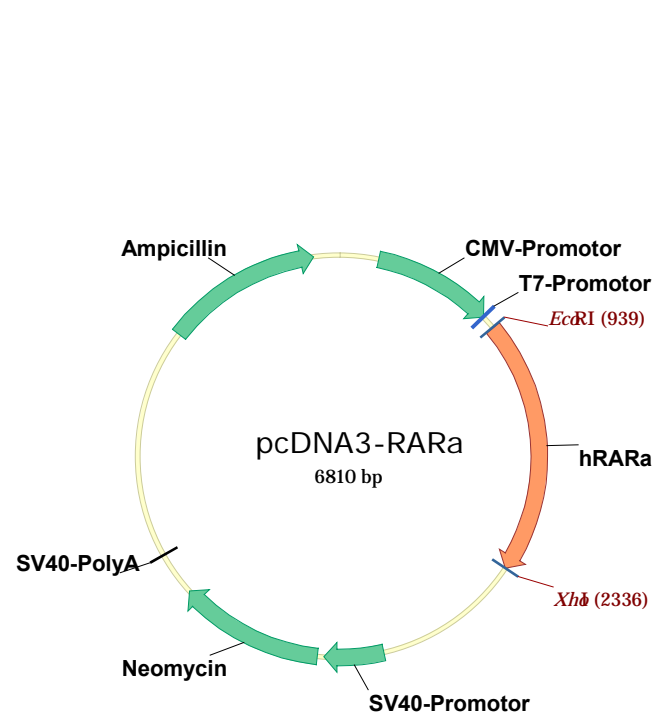
Das Plasmid ermöglicht die Expression von GST-RXR α DBD (AS 140-238) in prokaryotischen Organismen.

- **Konstrukt pGEX-4T1avi-hRXR α LBD**

Klonierungsstrategie: Die LBD des hRXR α wurde mit den Primern hRXRaCTs und hRXRaAS aus pSG5-hRXR α amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pGEX-4T1avi ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Das Plasmid ermöglicht die Expression von GST-RXR α LBD (AS 239-481) in prokaryotischen Organismen.

7.3 Eukaryontische Expressionsvektoren



pcDNA3-RARα

Klonierungsstrategie: RARα wurde mit den Primern hRARαS und hRARαAS aus pRS-hRARα (siehe Material) amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pcDNA3 ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Abb. 7.7: Schematische Darstellung des Konstrukts pcDNA3-RARα.

Das Plasmid ist zur eukaryontischen Expression und *in vitro*-Translation von hRARα geeignet.

CMV-Promotor: Promotor des Cytomegalie-Virus; **T7-Promotor:** Promotor für T7; **hRARα:** codiert für die AS 1-462 des humanen RARα; **SV40-Promotor:** Promotor des Simian-Virus 40; **Neomycin:** Neomycin-Resistenzgen; **SV40-Poly A:** Simian-Virus 40 Polyadenylierungsstelle; **Ampicillin:** Ampicillin-Resistenzgen.

Die folgenden Vektoren basieren ebenfalls auf pCDNA3 und wurden in einer ähnlichen Weise kloniert:

- **Konstrukt pcDNA3-RXRα**

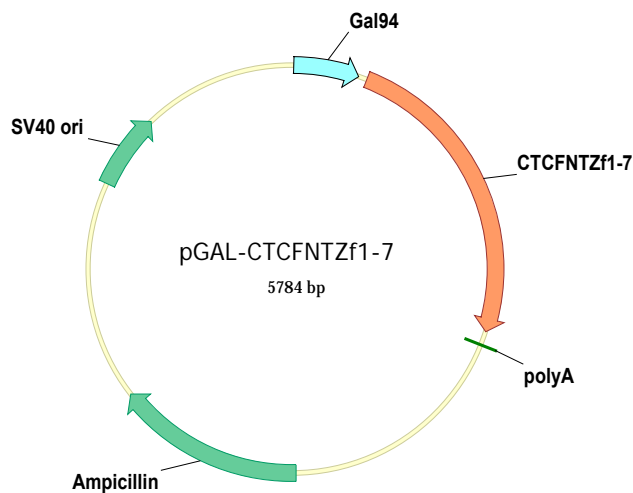
Klonierungsstrategie: RXRα wurde mit den Primern hRXRaS und hRXRaAS aus pSG5-hRXRα amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pcDNA3 ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Der Vektor pCDNA3-RXRα wurde für die eukaryontische Expression und *in vitro*-Translation von hRXRα verwendet.

- **Konstrukt pcDNA3-TR DBD**

Klonierungsstrategie: TR DBD wurde mit den Primern hTRDBDs und hTRDBDas aus pRS-hTRβ amplifiziert und anschließend mit EcoRI und XhoI geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pcDNA3 ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Das Plasmid diente zur eukaryontischen Expression und *in vitro*-Translation von hTR DBD geeignet.



pGAL-CTCFNTZf1-7

Klonierungsstrategie: Hühner-CTCFNTZf1-7 wurde mit den Primern CTCFf1S und CTCFNTZf1-7AS aus pBK-CMV-CTCF amplifiziert und anschließend mit BglII geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pABgal94-linker (siehe Material) ligiert, der zuvor mit BamHI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Abb. 6.8: Schematische Darstellung des Konstrukts pGAL-CTCFNTZf1-7.

Das Plasmid ermöglicht die eukaryontische Expression von an die Gal-DNA-Bindedomäne-fusionierten Hühner-CTCFNTZf1-7, das die AS 1-463 beinhaltet.

Gal94: Aminosäuren 1-94 des Hefe-Gal4-Aktivators, welche die DBD enthalten; Ampicillin: Ampicillin-Resistenz; *SV40 ori*: Replikationsursprung des Simian-Virus 40; *Poly A*: Polyadenylierungssignal.

Der folgende Vektor beruht ebenfalls auf pABgal94-linker und wurde in einer ähnlichen Weise kloniert:

- **Konstrukt pGAL-CTCFNTZf1-4**

Klonierungsstrategie: Hühner-CTCFNTZf1-4 wurde mit den Primern CTCFf1S und CTCFNTZf1-4AS aus pBK-CMV-CTCF amplifiziert und anschließend mit BglII geschnitten. Das resultierende Insert wurde mit pABgal94-linker ligiert, der zuvor mit BamHI geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert worden war.

Das Plasmid ist für die eukaryontische Expression von Hühner-CTCFNTZf1-4 (AS 1-380) fusioniert an die DNA-Bindedomäne von Gal4 geeignet.

**D
a
n
k
e**

Danke

**D
a
n
k
e**

Nach 4 langen Jahren kann ich nun endlich als Abschluss meiner Doktorarbeit die Danksagung schreiben. Habe teilweise nicht gedacht, dass es mal soweit kommt, vor allem da ich doch mehrmals mein Thema „wechseln“ musste. An dieser Stelle möchte ich mich nun bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und mich unterstützt haben.

Zuerst einmal danke ich natürlich meinem Chef und „Doktorvater“ Prof. Renkawitz, der mich trotz (oder gerade wegen?) meines H & E-Studiums (unter Kennern auch als Haushalt & Erotik bekannt) an Bord des Instituts gelassen hat. Vielen Dank für die Finanzierung, die Unterstützung in jeder Hinsicht, die Geduld und Gelassenheit in schwierigen Zeiten. Bedanken möchte ich mich auch besonders für die Möglichkeit, am Graduiertenkolleg teilzunehmen.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch Jörg, unserem Laborleiter. Er war immer da, wenn ich seine Unterstützung brauchte. Sein chemisches Wissen und seine lange Laborerfahrung waren immer wichtig in Situationen, in denen ich nicht mehr weiter wusste. Außerdem war Jörg immer unterhaltsam in Bezug auf Diäten, der schwedischen Sprache, Neuigkeiten auf der Spiegel-Internetseite... Sehr lustig war es mit ihm, wenn er sich abends mal auf ein Bier zu uns gesellte.

Ganz besonders ans Herz gewachsen ist mir auch der Rest der Labor329-Crew: mein Kollege Ölle, der immer die Ruhe weg hat (bis auf ein paar wenige Wutausbrüche), mir besonders bei schwierigen Klonierungen geholfen hat und immer zu philosophischen Ausschweifungen über Fußball, Wetter, Schnitzel, Jägermeister und Gartenarbeit bereit war. „Die Frau mit den Wuschelhaaren“ - Imke, die mich von Anfang an begleitet hat. Zusammen haben wir Les' Wutausbrüche, unsere erste Maxi (3 Stunden austarieren), unsere ersten Praktikanten (hallo CP) und die Tücken des Laboralltags durchgestanden. Ich freue mich, dass sie meine Nachfolgerin im Graduiertenkolleg ist.

Unser Laborküken CP, die mir nicht nur manchmal Maxis oder andere Dinge abgenommen hat und immer Verständnis für mich hatte (ich sag` nur Trostschokolade), sondern die mir auch durch gewisse Laute (hicks) und lauten Flüchen in Erinnerung bleiben wird. Die Macht (und vor allem Stärke) möge mit ihr sein!

Danke auch an Peter und unsere Diplomanden Leona und Magda, die uns mit ihren tollen Geschichten erfreute („unten ohne im Labor“).

Dank gebührt auch den Leuten aus den anderen Laboren: Marek für seine Hilfsbereitschaft und seinem fantastischen Wissen. Bis jetzt bin ich immer noch auf der Suche nach einem Gebiet, wo er mal gar keine Ahnung hat. Vielen Dank auch für das leckere Sushi. Angie für ihre unterhaltsame Art, Manu für die Fliegen in den Getränken, Leni für ihre Hilfsbereitschaft und Geschichten von früher, Gong für seine Hilfe und Einblick in die chinesische Kultur, Anna für ihre Hilfe mit Verträgen und jeder anderen Art von Wehwehchen, Sonja für Ihre fröhliche Art, Doris für ihre Fürsorge und Bereitstellung von Medien usw., Birgitte und Christa für ihre großartige Unterstützung, Andreas für seine fantastisches handwerkliches Geschick, Herrn Henze für seine Hilfe und guten Weingeschmack, Frau Anders für ihre rührende Art, Martin Schulz für seine konstruktive Kritik spätabends, Helmut für seine riesige Laborerfahrung.

Nicht vergessen möchte ich auch die ganzen „Ehemaligen“. Gerade die ersten 2-3 Jahre am Institut waren eine ganz besondere Zeit, die ich nicht so schnell vergessen werde: die unzähligen Grillabende, Bowlingevents oder einfach nur Bier auf dem Balkon mit Christina, Marc, Udo, Oli, Maren, Frauke, Michi, Ru, Les, Aria usw.

Danken möchte ich auch meiner Ex-Diplomandin Christina N., die zwar Probleme mit der deutschen Sprache hat, aber sonst sehr amüsant und eine (meistens) pflegeleichte Diplomandin war.

Viel Spaß hatte ich auch mit meiner Graduiertenkolleg-Crew Christina, Alex, Miro und Anne. Wir haben nicht nur Geschichten aus dem Laboralltag geteilt, sondern auch Tequila zum Nationalgetränk erklärt, wovon wir übrigens auch die Holländer im KWT überzeugen konnten.

Zwar zuletzt genannt, aber nicht weniger wichtig zu erwähnen: meine Familie. Ihr bin ich nicht nur für Finanzspritzen, sondern auch für Beistand in jeder Situation dankbar. Manchmal war es ganz gut, dass sie mir wieder die wichtigen Dinge im Leben gezeigt haben. Vielen Dank auch an meinen Freund Olli, der immer für mich da war und mich in jeder Stimmungslage ertragen hat. Que viva Mexico!

Nicht so schnell vergessen werde ich:

- Imkes Zugfahrt bis nach Kassel, obwohl sie in Gießen aussteigen wollte.
- Angies Zusammenprall mit einem Pferd
- Jörgs Rekord von 54 Cola-light Flaschen im Büro
- Jörgs Unfall mit Etidymbromid und anschließender Kontrolle mit UV-Licht (obwohl es keiner von uns selbst erlebt hat)
- Udos Arbeitsbeginn um 11.20 Uhr, um dann um 11.30 Uhr mit uns Essen zu gehen.
- Jörgs unvergessliche Geschichten (ich sag` nur 2 Vaginas)
- Instituts-Grillabende im Regen
- Jörgs Kohlsuppen-Diät
- diverse Faschingsabende im Ascot
- Jörgs schwere Zunge nach nur wenigen Flaschen Bier
- Gongs seltene Selbstversuche zur Alkoholhöchstmenge, die ein asiatischer Mensch vertragen kann
- die Überflutung in Lab329 durch die Wasserstrahlpumpe
- das Warten am Aufzug und Auftreiben aller Leute, die mit zum Essen gehen, von 11.25 – 11.40 Uhr
- die Bowlingabende
- Manus Obstsalat mit ungeschälten Kiwis
- CPs Versuch, Objektträger abzuflammen
- Kartenblasen mit Jörg an der Weihnachtsfeier
- das Steckenbleiben im Aufzug
- Ölles Trockeneis-Spielen
- Mareks Schweißperlen an der Stirn
- Manus Belagerung von Jörg

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend aus anderen Arbeiten übernommen wurden, sind mit Quellenangabe als Zitat kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in dieser oder veränderter Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Gießen, den

.....

Christine Weth